techniques de laboratoire
12

LA PRATIQUE DE L'ANALYSE CHROMOSOMIQUE

B. DUTRILLAUX J. COUTURIER



LA PRATIQUE
DE L'ANALYSE
CHROMOSOMIQUE.

CHEZ LE MÊME ÉDITEUR

Dans la même collection:

1. LA PRATIQUE DE L'IMMUNOÉLECTROPHORÈSE, par M. KAMINSKI. 1979, 88 pages, 34 figures.
2. LA PRATIQUE DE L'ULTRACENTRIFUGATION ANALYTIQUE, par G. BATELIER. 1979, 88 pages, 40 figures.
3. LA PRATIQUE DU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE A BALAYAGE EN BIOLOGIE, par D. GUILLAUMIN. 1980, 128 pages, 51 figures.
4. LA PRATIQUE DU MICROSCOPE ÉLECTRONIQUE CONVENTIONNEL, par R. et J. HAGÈGE. 1980, 128 pages, 28 figures, 21 planches.
5. INTRODUCTION A L'EMPLOI DES RADIOÉLÉMENTS EN BIOLOGIE ET EN BIOCHIMIE, par S. APELGOT. 1981, 80 pages, 32 figures.
6. LA PRATIQUE DE L'AGGLUTINATION DES ERYTHROCYTES ET DU TEST DE COOMBS, par Ph. ROUGER et Ch. SALMON. 1981, 88 pages, 22 figures.
7. LE RAT DE LABORATOIRE, par G. JADOT. 1-Réactif biologique. 1981, 96 pages, 11 figures.
8. LES MÉTHODES DE PURIFICATION ET D'ANALYSE DES PROTÉINES, par J.-M. FRÈRE et Ch. GERDAY. 1981, 128 pages, 42 figures.
9. LA PRATIQUE DE L'ÉLECTROPHORÈSE APPLIQUÉE A LA DÉTECTION DES POLYMORPHISMES HUMAINS, par J. SÉGER et G. LUCOTTE. 1981, 116 pages, 63 figures.
10. LA PRATIQUE DES GROUPES ET GROUPAGES ÉRYTHROCYTAIRES, par Ph. ROUGER et Ch. SALMON. 1981, 120 pages, 6 figures.
11. LA PRATIQUE DES AUTO ET ALLO-ANTICORPS ANTIÉRYTHROCYTAIRES, par Ph. ROUGER et Ch. SALMON. 1981, 116 pages, 18 figures.

Autres ouvrages:

DICTIONNAIRE DE GÉNÉTIQUE, par P. L'HERITIER. *Collection de dictionnaires spécialisés de médecine et de biologie, sous la direction de A. MANUILA.* 1978, 272 pages, 6 figures.
BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET ÉVOLUTION, par F. AYALA. 1981, 136 pages, 60 figures (à paraître).
LE POLYMORPHISME BIOCHIMIQUE ET LES FACTEURS DE SON MAINTIEN, par G. LUCOTTE. 1977, 72 pages, 19 figures.
MANUEL PRATIQUE D'EMBRYOLOGIE EXPÉRIMENTALE, par J. SCHILT, A.M. BAUTZ et A. BAUTZ. 1981, 144 pages.
GÉNÉTIQUE ET AMÉLIORATION DES PLANTES, par Y. DEMARLY. *Collection Sciences Agronomiques.* 1977, 304 pages, 175 figures.

techniques de laboratoire

12

LA PRATIQUE DE L'ANALYSE CHROMOSOMIQUE.

Bernard Dutrillaux
Maître de recherche
au CNRS

Jérôme Couturier
Chargé de recherche
au CNRS

MASSON
Paris New York Barcelone Milan Mexico Rio de Janeiro
1981

ISBN: 2-225-74052-6
ISSN: 0240-2351

MASSON S.A.	120, bd St-Germain, 75280 Paris Cedex 06
MASSON PUBLISHING U.S.A. Inc.	133 East 58 th Street, New York, N.Y. 10022
TORAY-MASSON S.A.	Balmes 151, Barcelona 8
MASSON ITALIA EDITORI S.p.A.	Via Giovanni Pascoli 55, 20133 Milano
MASSON EDITORES	Dakota 383, Colonia Napoles, Mexico 18 DF
EDITORA MASSON DO BRASIL Ltda	R. da Quitanda, 20/s 301 Rio de Janeiro R.J.

Table des matières

Introduction

La cytogénétique est pratiquement née avec ce siècle. Elle est encore considérée comme une discipline jeune, en raison sans doute des progrès récemment accomplis, qui en ont transformé les méthodes et les applications.

Après qu'on se soit longtemps contenté d'analyser les tissus montrant spontanément des cellules en mitose, tel l'épithélium séminifère, un premier progrès a été réalisé, la culture cellulaire, qui permet d'obtenir un grand nombre de figures mitotiques.

Le choc hypotonique, découvert en 1952 par Hsu, devait être une seconde étape décisive, puisqu'il permet un gonflement cellulaire, et donc une meilleure répartition des chromosomes. Il fallut toutefois attendre 1956 pour que la formule chromosomique de l'homme soit précisée par Tjio et Levan, et 1959 pour que la première anomalie chromosomique soit décrite par Lejeune et ses collaborateurs.

La mise au point des cultures sanguines devait faciliter beaucoup les analyses et fut sans doute responsable du grand essor de la cytogénétique moderne, depuis 1960 (Moorhead et coll.).

Enfin, la découverte des bandes chromatidiennes (Caspersson et coll., 1970, Dutrillaux et Lejeune, 1971, Summer et coll., 1971) changeait radicalement les potentialités d'analyse et faisait entrer la cytogénétique dans sa phase actuelle.

Dans cet ouvrage, nous allons successivement considérer les différentes méthodes permettant d'obtenir des cellules en division par culture, sans négliger toutefois la possibilité d'observer les chromosomes sur des tissus non cultivés, telles la moëlle osseuse et l'épithélium séminifère.

Les méthodes purement cytologiques, pour obtenir des étalements chromosomiques seront détaillées.

Un développement tout particulier sera donné à la description des nombreuses méthodes de marquage.

Techniques d'obtention des préparations chromosomiques.

Bien que les préparations chromosomiques puissent être obtenues directement sur des tissus spontanément en division active (moëlle osseuse, tissu testiculaire, tissus néoplasiques...), on a le plus souvent recours à la culture de cellules (lymphocytes, fibroblastes, cellules ammiotiques...).

Techniques de culture

Les types cellulaires à partir desquels les caryotypes sont le plus souvent étudiés sont les lymphocytes et les fibroblastes. Chacun requiert des conditions de culture particulières. Les méthodes de culture sont extrêmement nombreuses, celles que nous décrirons sont celles qui nous paraissent donner les résultats les meilleurs et les plus reproductibles.

Lymphocytes

Depuis la découverte des propriétés mitogèniques de la phytothémagglutinine (PHA), les lymphocytes, par la simplicité de leur prélèvement, sont le matériel de choix pour l'obtention des préparations chromosomiques. La technique décrite est dérivée de celle de Moorhead et coll. (1960). La culture peut être effectuée après isolement des lymphocytes, toutefois ce procédé ne paraît pas améliorer la qualité des préparations chromosomiques; ainsi, dans la technique habituelle, on ensemence le sang total.

a) *Prélèvement.* — Deux modes de prélèvement peuvent être employés: chez le nourrisson, le micro-prélèvement de sang capillaire, chez l'adulte, le prélèvement veineux. Dans tous les cas, ce geste doit être bien entendu effectué stérilement.

☐ Micro-prélèvement de sang capillaire. — Une pulpe digitale, ou le talon, est désinfecté à l'alcool à 70°, puis à l'éther. Après séchage, une scarification est effectuée à l'aide d'un vaccinostyle stérile. Le sang est recueilli à la pipette Pasteur et ensemencé directement dans le milieu.

☐ Prélèvement veineux. — 5 à 10 ml de sang sont prélevés à la seringue et rejetés dans un flacon contenant 100 U.I. d'héparine sans conservateur (héparine sèche Choay, par exemple). Le flacon a l'avantage de permettre l'expédition facile du prélèvement. La mise en culture peut être retardée de 5 jours au maximum, sans affecter notablement le résultat final. Dans ces conditions, le stockage ou le transport doivent avoir lieu à une température comprise entre + 4 et 20 °C. Le prélèvement peut être aussi simplement effectué à la seringue héparinée (100 U.I.).

b) *Culture*

☐ Matériel. — Les cultures sont effectuées dans des tubes de verre ou de plastique ayant une contenance de 9 à 10 ml. Les tubes sont munis d'un bouchon à vis et présentent un méplat afin de pouvoir être disposés horizontalement dans l'étuve. Le tube *Rossignol* a, de surcroît, un fond conique, ce qui permet d'effectuer sans transvasement toutes les opérations de centrifugation.

☐ Milieu de culture. — Chaque tube est rempli avec le milieu suivant:

— TC 199 avec antibiotiques (pénicilline: 100 U.I./ml, streptomycine: 100 μg/ml) = 6 ml

— sérum humain = 2 ml

— héparine = 100 U.I.

— phytothémaglutinine: PHA – C (I.B.F.) ou PHA – P (Difco) = 0,05 ml.

Dans certains cas particuliers, on peut être amené à employer d'autres lectines mitogènes (concanavaline A, pokeweed mitogen...)

☐ Mise en culture. — Le sang total est ensemencé à raison de 0,6 ml par tube, chez l'adulte, ou 0,4 ml, chez l'enfant. Les tubes sont placés horizontalement à l'étuve à 37 °C. L'incubation a lieu en règle durant 72 h, mais peut être prolongée 24 h de plus sans inconvénient. Elle peut être raccourcie également de 24 h si l'on veut analyser les mitoses de première génération. Dans ce cas, la quantité de mitoses recueillies est beaucoup moindre.

c) *Récolte des mitoses*

☐ Accumulation des métaphases. — Deux heures avant la fin de la culture, les divisions sont arrêtées par l'addition dans chaque tube de 0,1 ml d'une solution de colchicine à 4 μg/ml. Les tubes sont remis à l'étuve à 37 °C.

☐ Traitement hypotonique. — A la fin du traitement par la colchicine, les tubes sont centrifugés (5 min. à 400 g, comme pour toutes les centrifugations suivantes). Le surnageant est rejeté par aspiration à la pipette Pasteur et les tubes sont alors remplis du milieu hypotonique suivant, maintenu à 37 °C:

— sérum humain : 1 vol.

— eau distillée : 5 vol.

D'autres laboratoires préfèrent employer comme solution hypotonique le KCl 0,075 M. Le culot est soigneusement remis en suspension par aspiration et refoulement à la pipette Pasteur munie d'une tétine sans provoquer la formation de bulles. Les tubes sont ensuite à nouveau remis à l'étuve pour 7 minutes.

☐ Fixation. — Le milieu hypotonique est décanté par centrifugation et le surnageant rejeté par aspiration à la pipette Pasteur; toutefois, une hauteur de 2 mm de milieu est laissée au-dessus du culot qui est délicatement remis en suspension dans ce faible volume.

Le premier fixateur est alors ajouté (fixateur de Carnoy) :

— éthanol absolu : 6 vol.

— chloroforme : 3 vol.

— acide acétique : 1 vol.

(tous les réactifs sont du degré de pureté «pour analyses»).

Dans un premier temps, les cellules sont remises en suspension dans seulement 1 ml de fixateur environ, puis le tube est entièrement rempli. La durée de cette première fixation est de 20 minutes.

Les tubes sont alors centrifugés et le premier fixateur rejeté. Ils sont remplis à moitié avec le deuxième fixateur (éthanol acétique) :

— éthanol absolu : 3 vol.

— acide acétique : 1 vol.

La durée de cette seconde fixation est de 15 minutes au moins mais peut être prolongée sans inconvénient, permettant ainsi, si besoin, de différer l'étalement d'un jour à l'autre.

☐ Étalement. — Les lames auront été préparées, au préalable, de la façon suivante : des lames très propres sont frottées une à une entre le pouce et l'index sous l'eau courante de façon à ce qu'un film d'eau puisse se maintenir parfaitement dessus. Elles sont ensuite placées dans un Bécher d'eau distillée et mises à la température de la glace fondante.

Les tubes sont centrifugés et le fixateur est en partie rejeté : on laisse une quantité variable avec l'importance du culot (en moyenne : 5 à 6 mm au-dessus de celui-ci). Les cellules sont remises en suspension dans ce volume. Cette suspension est reprise à la pipette Pasteur ; on laisse tomber d'une hauteur de 3 à 4 cm, l'une à côté de l'autre, deux gouttes sur une lame froide recouverte d'un fin film d'eau (pour ce faire, la lame est soigneusement drainée, sur champ, sur un papier filtre). D'autres lames sont ainsi préparées jusqu'à épuisement de la suspension (en moyenne, six lames par tube

peuvent être ainsi obtenues). On laisse les préparations sécher spontanément à l'air. Elles peuvent être ensuite, soit simplement colorées au Giemsa, soit traitées pour obtenir des marquages.

Fibroblastes

Les biopsies cutanées sont la source la plus habituelle de fibroblastes pour l'obtention de cultures cellulaires en vue de la détermination du caryotype. Cependant, des fragments de nombreux autres tissus (aponévrose, muscles, reins, gonades...) peuvent être aussi utilisés pour initier des cultures cellulaires.

a) *Biopsie cutanée.* — Toutes les manipulations décrites doivent être, bien entendu, effectuées stérilement.

☐ Nettoyage de la région choisie (habituellement la face interne du bras) à l'alcool à 70°, puis à l'éther.

☐ Infiltration sous-cutanée de xylocaïne à 1 p. 100. Attendre l'installation de l'anesthésie locale.

☐ Prélèvement à l'emporte-pièce de 4 mm (une profondeur de 1 mm est suffisante). Saisir à la pince le fragment détaché et couper le pédicule le retenant au tissu sous-cutané.

Le prélèvement peut être aussi effectué au bistouri : un petit bourrelet d'épiderme formé par une pince est découpé au-dessus de celle-ci sur une hauteur de 1 mm et une longueur de 2 mm.

Le prélèvement fait, tamponner à la compresse le léger écoulement sanglant pouvant se produire ; rapprocher les deux lèvres de l'incision à l'aide de « Steri-strips » et faire un pansement légèrement compressif qui sera laissé en place une semaine.

☐ Les fragments biopsiques sont recueillis dans des tubes stériles contenant du milieu de culture ou une solution saline équilibrée (solution de Hanks, par exemple).

b) *Établissement de la culture*

☐ Réalisation des explants. — L'échantillon est placé dans une boîte de Petri avec une petite quantité de milieu de culture. Il est ensuite découpé en petits fragments cubiques de 0,5 mm de côté environ, à l'aide d'un scalpel.

☐ Mise en culture. — Dix de ces fragments, environ, sont transférés, à l'aide d'une pipette Pasteur, dans un flacon plastique de 25 cm^2 où ils sont régulièrement répartis. On ajoute alors la quantité de milieu de démarrage juste suffisante pour baigner les explants, sans les faire flotter (soit environ 0,7 ml par flacon de 25 cm^2).

Milieu de démarrage :

— milieu de Eagle MEM à base Hanks = 80 p. 100
— sérum de veau fœtal = 20 p. 100
— pénicilline : 100 U.I/ml
— kanamycine : 100 μg/ml
— mycostatine : 100 μg/ml (facultatif).

Chaque flacon est gazé (de même que lors des étapes suivantes) avec un mélange air 95 p. 100, CO_2 5 p. 100, hermétiquement fermé, et mis à l'étuve à 37 °C.

Au bout de deux jours, les explants doivent adhérer au fond du flacon ; le milieu est retiré et remplacé par 2 ml de milieu frais. Les flacons sont ensuite laissés tels quels une semaine.

Le milieu est ensuite renouvelé deux fois par semaine, environ, et, dès que la multiplication cellulaire est active (virage rapide du rouge de phénol au jaune), le milieu de démarrage est remplacé par le milieu de croissance.

Milieu de croissance :

— milieu de Eagle MEM à base Earle = 90 p. 100
— sérum de veau = 10 p. 100
— antibiotiques : comme milieu de démarrage.

Fréquemment, la première pousse cellulaire, à partir de biopsies cutanées, est de type épithélial. Il a été remarqué que, bien que rarement très gênante, celle-ci pouvait être évitée par une mise en culture différée des biopsies : une attente de 3 à 4 jours à + 4 °C dans le milieu de culture donne de bons résultats.

Lorsque l'auréole de croissance est suffisante (généralement entre la 2e et la 3e semaine), les explants sont retirés et éventuellement transférés dans un autre flacon. Une *trypsination* est effectuée afin d'assurer une meilleure répartition des cellules et une multiplication plus rapide : après rejet du milieu, le flacon est d'abord rapidement rincé par une solution de trypsine à 0,2 p. 100, ensuite, 1 ml de la solution de trypsine est ajouté et le flacon est remis à l'étuve.

Solution de trypsine à 0,2 g/100 ml :

— trypsine (1/250 Difco) : 0,2 g
— milieu de Eagle MEM : 100 ml
— ajuster le pH à 7,6 par addition de tampon Tris à 2 p. 100
— filtrer sur filtre Millipore 0,22 μ.

La désagrégation des amas cellulaires par la trypsine est surveillée au microscope inversé et lorsqu'elle est jugée satisfaisante (en général au bout

de 5 minutes), 5 ml de milieu de croissance sont ajoutés. Un pipetage énergique est effectué afin d'achever la dissociation des cellules et d'assurer leur répartition. La confluence est le plus souvent atteinte dans les 72 heures.

c) *Divisions de la culture (passages).* — Lorsque la confluence est atteinte, le flacon est *trypsiné* comme ci-dessus mais quand le décollement des cellules est complet, l'action de la trypsine est neutralisée par l'addition de seulement 1 ml de milieu de culture.

Ces 2 ml de suspension cellulaire sont répartis dans deux nouveaux flacons de 25 cm^2 (ou un flacon de 75 cm^2).

Le milieu est renouvelé deux fois par semaine (6 ml pour les flacons de 25 cm^2, 18 ml pour ceux de 75 cm^2).

Lorsque la confluence est à nouveau atteinte, une nouvelle division de la culture est effectuée.

d) *Préparations chromosomiques.* — Dès que l'on a obtenu deux flacons de 25 cm^2, l'un peut être destiné à la détermination du caryotype, l'autre permettant de poursuivre la culture de la souche.

La récolte des cellules est effectuée de préférence le lendemain d'un passage.

Un volume de 0,1 ml d'une solution de colchicine à 4 μg/ml est ajouté dans le flacon. Deux heures après, le milieu de culture est récupéré dans un tube à centrifuger de 10 ml et les cellules adhérant au flacon sont *trypsinées* à 37 °C par addition d'1 ml de la solution de trypsine. Lorsqu'elles sont bien individualisées, la suspension est reprise à la pipette Pasteur et transférée dans le tube à centrifuger.

Les étapes suivantes : choc hypotonique, fixation, étalement, sont exactement identiques à celles de la technique utilisée pour les lymphocytes sanguins.

Cellules amniotiques

La technique décrite est celle de Boué et coll. (1979). Afin d'assurer le diagnostic chromosomique, d'aider à la différenciation des mosaïques constitutionnelles et des «pseudo-mosaïques» liées à des accidents de culture *in vitro,* il est recommandé d'utiliser une technique de culture en foyers et d'analyser les chromosomes *in situ.*

a) *Mise en culture.* — Le laboratoire reçoit en général un prélèvement de 10 à 20 ml de liquide amniotique prélevé par ponction entre la 16ᵉ et la 19ᵉ semaine (après les dernières règles). Les cultures sont faites dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre au fond desquelles est placée une lamelle de verre de 30 mm de diamètre. Deux milieux de croissance sont utilisés parallèlement pour chaque prélèvement : RPMI et HAM F 10 ; ils comportent des antibiotiques et sont supplémentés avec 20 p. 100 de sérum de veau foetal.

Chaque boîte contenant 1,5 ml de milieu de croissance est ensemencée avec 1,5 ml de liquide amniotique non centrifugé. Par ailleurs, 2 ml de liquide amniotique sont ensemencés dans un flacon contenant 4 ml de milieu de croissance. Ce flacon constitue une sécurité et, éventuellement, peut servir à un contrôle.

b) *Croissance.* — Les boîtes de Petri et le flacon sont mis à incuber à 37 °C dans une étuve à circuit d'air-CO_2 permettant de maintenir le pH du milieu à 7,3. Les boîtes sont laissées ainsi pendant 5 jours. Le milieu est alors aspiré à la pipette et remplacé par du milieu de croissance frais. Les changements de milieu suivants ont lieu ensuite tous les deux jours.

Dès que les premiers foyers de cellules sont suffisamment abondants (en moyenne, vers le 8e-12e jour de culture). On peut faire des préparations chromosomiques.

Les lamelles sont prélevées stérilement et transférées dans une nouvelle boîte de Petri contenant du milieu frais. Le lendemain, on contrôle au microscope inversé le moment où les mitoses sont nombreuses (en général, 20 à 22 heures après le transfert) et les préparations sont alors traitées. Les boîtes de Petri dans lesquelles les lamelles avaient été initialement placées sont conservées et remises à l'étuve à titre de sécurité.

c) *Réalisation des préparations chromosomiques.* — Les lamelles sont directement soumises au traitement hypotonique sans utilisation préalable de colchicine. Celle-ci n'est pas nécessaire compte-tenu de la relative synchronisation induite par les changements de milieu ; on obtient ainsi une moindre condensation chromosomique, ce qui augmente la définition de l'analyse après marquage.

Le milieu hypotonique est constitué de 5 ml de solution de Hanks diluée dans 95 ml d'eau à pH 7, et porté à 37 °C. Le milieu de culture est rejeté, la boîte est rincée rapidement avec le milieu hypotonique, remplie à nouveau et mise à incuber ainsi 15 minutes à 37 °C.

Au bout de ce temps, les lamelles sont fixées par immersion dans du Carnoy chloroformé (voir technique sur lymphocytes) durant une heure. On les laisse ensuite sécher spontanément à l'air.

Toutes les techniques de marquage décrites ensuite peuvent être appliquées à ces préparations.

d) *Détermination du caryotype fœtal.* — Elle est réalisée par l'analyse de quelques métaphases dans plusieurs colonies d'une même boîte et ceci dans plusieurs boîtes.

Techniques directes et cultures à très court terme

Dans des cas particuliers, lorsque l'examen porte sur des tissus spontanément en division, l'on peut obtenir des préparations chromosomiques sans

passer par le stade de la culture, ou bien en effectuant une culture à très court terme. On peut être amené à pratiquer ce genre de technique dans deux ordres de circonstances: l'étude de néoplasies, des leucémies en particulier, où l'on analysera la moëlle osseuse et même parfois le sang périphérique, et l'étude des cellules germinales à partir de biopsies testiculaires.

Étude des leucémies

Celle-ci vise essentiellement à mettre en évidence les remaniements acquis au cours du processus néoplasique. Il faut insister ici sur la difficulté de ces études, liée d'une part au fait que la fréquence des cellules porteuses du remaniement acquis est souvent faible et d'autre part à la qualité fréquemment médiocre des métaphases anormales.

C'est principalement dans la moëlle osseuse et, en cas de myélémie, dans le sang périphérique, cultivé sans mitogène, que seront retrouvées les anomalies.

a) *Étude de la moëlle*

☐ Prélèvement. — La moëlle est prélevée au trocart de Mallarmé comme pour un examen hématologique; un prélèvement de 0,5 ml est suffisant.

☐ Ensemencement. — Les tubes employés sont identiques à ceux utilisés pour la culture des lymphocytes décrite précédemment. Ils sont remplis avec le même milieu que pour celle-ci, en omettant simplement d'ajouter de la PHA. Trois tubes seront ensemencés chacun par 0,1 ml de moëlle, immédiatement après le prélèvement; l'un, comportant de la colchicine à la concentration habituelle, est destiné à l'examen direct, un autre sera mis à l'étuve durant 24 heures à 37 °C, le dernier durant 48 heures.

☐ Récolte des cellules. — Dans chaque cas, les cellules sont récoltées après deux heures de traitement par la colchicine selon la technique décrite pour les lymphocytes. Les résultats sont variables selon les patients, c'est la raison pour laquelle il est nécessaire de prévoir trois tubes récoltés à des moments différents. En moyenne, c'est la culture de 24 heures qui donne les mitoses les mieux analysables.

b) *Étude du sang périphérique.* — Dans les cas où existent des cellules *blastiques* circulantes, il est utile de faire un examen à partir du sang périphérique. Celui-ci présente en effet deux avantages: les mitoses observées, contrairement à celles de la moëlle, sont à coup sûr pathologiques, d'autre part, leur qualité est souvent meilleure.

Les conditions de culture sont identiques à celles de la moëlle; toutefois on omettra le tube pour examen direct, les mitoses étant très rares avec le sang périphérique. La quantité de sang à ensemencer est fonction du nombre de leucocytes: par exemple, pour un nombre de 100 000 leucocytes par

mm^3, on ensemencera 0,1 ml de sang par tube. Parallèlement, on effectuera une culture de 72 heures en présence de PHA, afin d'établir le caryotype constitutionnel du patient et d'affirmer la nature acquise d'un remaniement constaté dans la moëlle ou dans les cultures de sang périphérique sans PHA.

c) *Étude des cellules des tissus lymphoïdes.* — Nous allons décrire la méthode d'analyse de cellules de ganglions lymphoïdes, la technique pouvant être adaptée à la rate par exemple.

Le fragment biopsique est placé dans un milieu physiologique stérile, pour le transport. A l'arrivée au laboratoire, il sera transféré dans une petite boîte de Petri avec 1 ml de milieu (TC 199, par exemple).

Le reste du milieu est centrifugé, et s'il existe un culot, celui-ci sera traité comme les cellules obtenues par dilacération de la biopsie.

Après avoir partagé la biopsie en deux parties égales, l'une des parties est dilacérée à l'aide de deux bistouris dans du liquide physiologique, celui-ci étant prélevé à la pipette pasteur et remplacé trois fois de suite, afin de récupérer les cellules mises en suspension.

— Centrifuger le liquide ainsi prélevé;

— Faire un choc hypotonique de 20 mn à 37 °C dans 20 ml de citrate de sodium à 1 p. 100 ou du chlorure de potassium à 0,56 p. 100;

— Centrifuger et remettre le culot en suspension dans 0,5 ml;

— Ajouter quelques gouttes de fixateur de Carnoy sans chloroforme, puis ajouter à nouveau 1 ml;

— Après 5 mn, centrifuger à nouveau, et changer le fixateur;

— Centrifuger à nouveau après 30 minutes et remettre les cellules en suspension dans une petite partie du liquide surnageant;

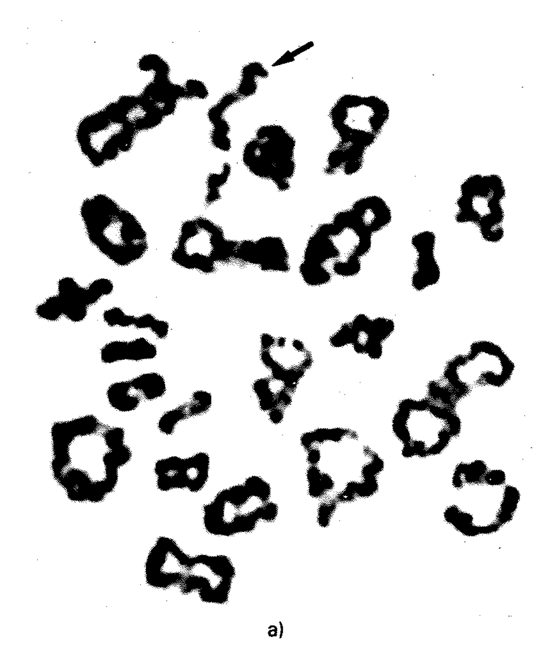
— Étaler une goutte sur la lame et vérifier la concentration en cellules au microscope en contraste de phase. On ajustera ensuite éventuellement la concentration de la suspension avant de procéder à l'étalement de l'ensemble.

La seconde moitié de la biopsie est dilacérée stérilement, et les cellules mises en suspension sont récupérées comme ci-dessus pour être placées dans des tubes de culture en présence de milieu (TC 199 + sérum + héparine + phytohémagglutine), comme du sang. Un tube pourra être préparé sans phytohémagglutinine.

Mettre à l'étuve à 37 °C, et remplacer le milieu par du milieu frais après 24 h. Remettre à l'étuve pour 24 h.

Après ces 48 h de culture, procéder à la même technique que pour l'examen direct.

Les fragments tissulaires résiduels, après dilacération, peuvent être plantés comme une biopsie pour culture tissulaire.



a)

Fig. 1. — *Méïose masculine: diacinèse.*

a) coloration au Giemsa. La flèche indique le bivalent sexuel. b) caryotype ordonné d'une diacinèse après technique de bandes T. Coloration à l'acridine orange.

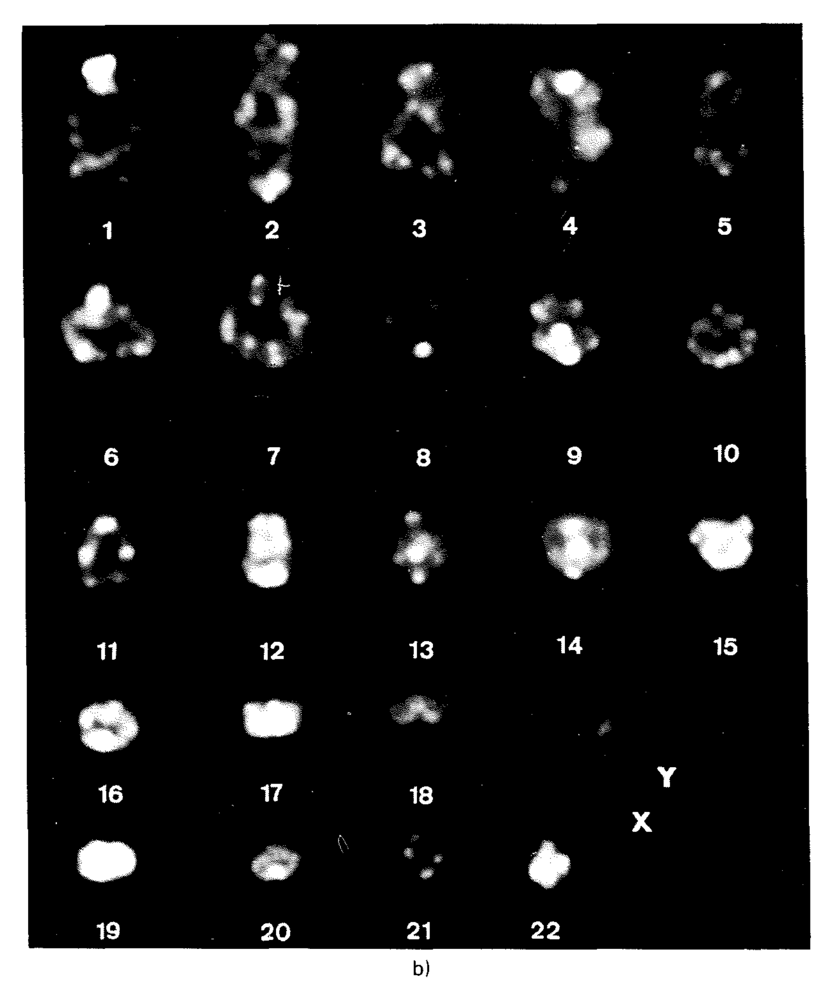
Étude des cellules germinales

a) *Étude directe de la méiose mâle.* — Bien qu'ayant été sur un plan historique, la première permettant l'analyse chromosomique, la méthode d'analyse de cellules méiotiques n'a pas suivie les mêmes progrès que celle des chromosomes mitotiques.

☐ Prélèvement. — Biopsie ou ponction au trocart peuvent être toutes deux utilisées, en milieu chirurgical. La biopsie est toutefois nettement préférable car les risques d'hémorragie sont moindres, et elle permet d'obtenir plus de matériel.

☐ Transport. — Aussi bref que possible, il peut toutefois durer jusqu'à près d'une heure à température ambiante sans inconvénient majeur. Le fragment biopsique est placé dans du citrate trisodique à 1 p. 100 fraîchement préparé.

☐ Obtention des cellules. — Les tubes séminifères sont dilacérés, soit à l'aide de petits ciseaux, soit avec des aiguilles montées. Cette manipulation se fait dans le milieu de transport, placé dans une petite boîte de Petri ou dans un verre de montre.

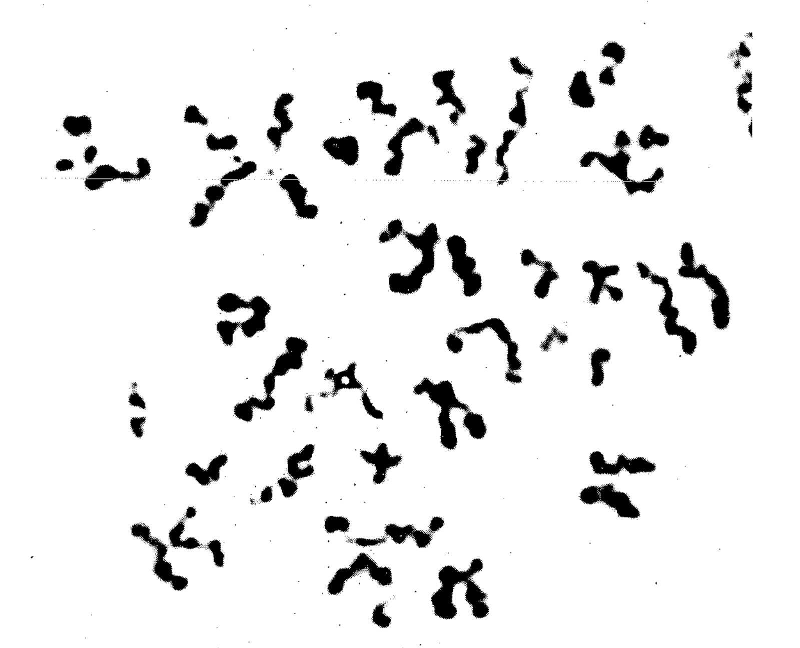


b)

La suspension cellulaire ainsi obtenue est placée, à la pipette, dans un tube à centrifuger. Cette opération est répétée aussi longtemps que le liquide reste opalescent après dilacération. Elle nécessite, au plus, 5 minutes. La suspension recueillie sera laissée en attente une dizaine de minutes avant d'être centrifugée à 1 000 - 1 500 t/mn (400 à 600 g) pendant 5 minutes.

Le liquide surnageant sera ensuite éliminé et remplacé par du fixateur.

La fixation et l'étalement sont identiques à ceux décrits pour les cellules mitotiques. Cette méthode permet l'observation de cellules en diacinèse et en métaphases I et II de bonne qualité et en grand nombre (fig. 1 et 2). Elle diffère très peu de la description originale de Evans et coll. (1964).



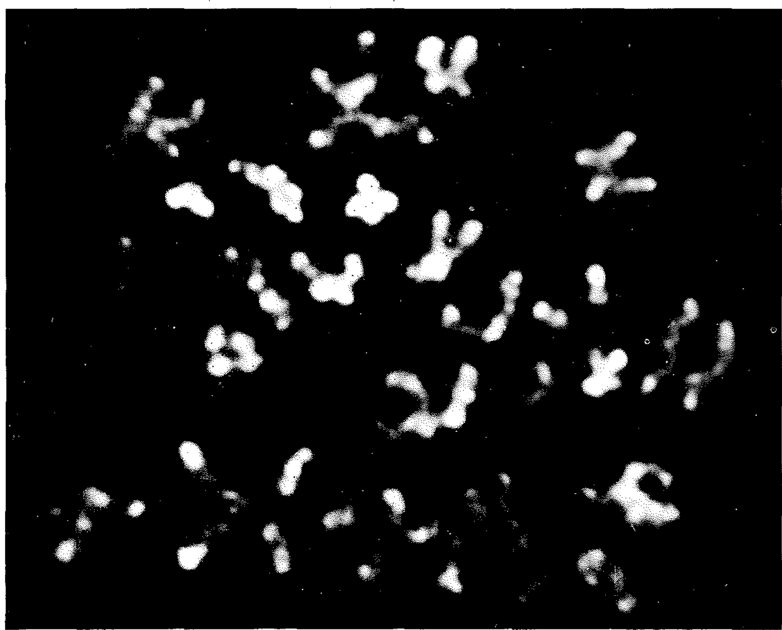


Fig. 2. — *Métaphase de spermatocyte II.*

En haut, coloration au Giemsa ; en bas, marquage de la même cellule en bandes T, coloration par l'acridine orange (image en miroir). Le marquage permet la reconnaissance des chromosomes.

• Variante pour l'obtention de mitoses spermatogoniales. — L'utilisation d'un milieu de transport physiologique, telle la solution de Earle, de Hanks etc..., dans lequel est aussi effectué la dilacération, et d'un liquide hypotonique constitué de sérum humain dilué au tiers dans de l'eau distillée, permet d'obtenir plus de figures mitotiques et de meilleure qualité (fig. 3).

• Variante pour l'obtention de stades pachytènes. — Pour améliorer la dispersion des chromosomes des cellules au stade pachytène durant lequel les chromosomes montrent spontanément des structures caractéristiques, plusieurs auteurs ont proposé des variantes techniques. Nous décrirons celle proposée par Luciani et coll. (1975):

— placer les fragments biopsiques dans une solution de KCl à 0,44 p. 100, et les laisser ainsi durant 8 à 10 heures, à la température ambiante;

— transférer les fragments dans du fixateur composé d'alcool méthylique (3 vol.) et d'acide acétique (1 vol.) où ils séjourneront 12 à 18 heures, avant de les y dilacérer;

— récupérer la suspension pour la centrifuger;

— rediluer le culot dans de l'acide acétique glacial dilué à 45 p. 100, et centrifuger immédiatement avant de procéder à l'étalement du culot remis en suspension dans quelques gouttes de surnageant.

☐ Marquage des cellules germinales. — Le marquage et la coloration des cellules germinales ne présente aucune difficulté particulière. Toutefois, la qualité des chromosomes étant en générale assez pauvre, les résultats obtenus ne sont pas aussi beaux que pour les cellules somatiques. Les techniques utilisables sont strictement superposables à celles utilisées pour les cellules somatiques, qui seront décrites plus loin. D'après notre expérience, les marquages en bandes C et T donnent des résultats très reproductibles. Les marquages en bandes Q sont plus aléatoires, mais restent intéressants pour la reconnaissance de certains segments hétérochromatiques, dont celui du bras long de l'Y humain en particulier.

b) *Méthode différée d'étude de la méiose mâle.* — Quelques essais ont été effectués pour maintenir en survie, voire pour cultiver, les cellules germinales.

Les cellules peuvent être maintenues à 36 °C en suspension, ou du moins en phase liquide pendant 48-72 h, après dilacération effectuée stérilement. Le milieu utilisé est constitué de liquide de Eagle additioné de 10 p. 100 de sérum de veau fœtal.

Le simple maintien du fragment biopsique, non dilacéré, dans ce même milieu, permet encore d'observer des images méiotiques après 8 jours.

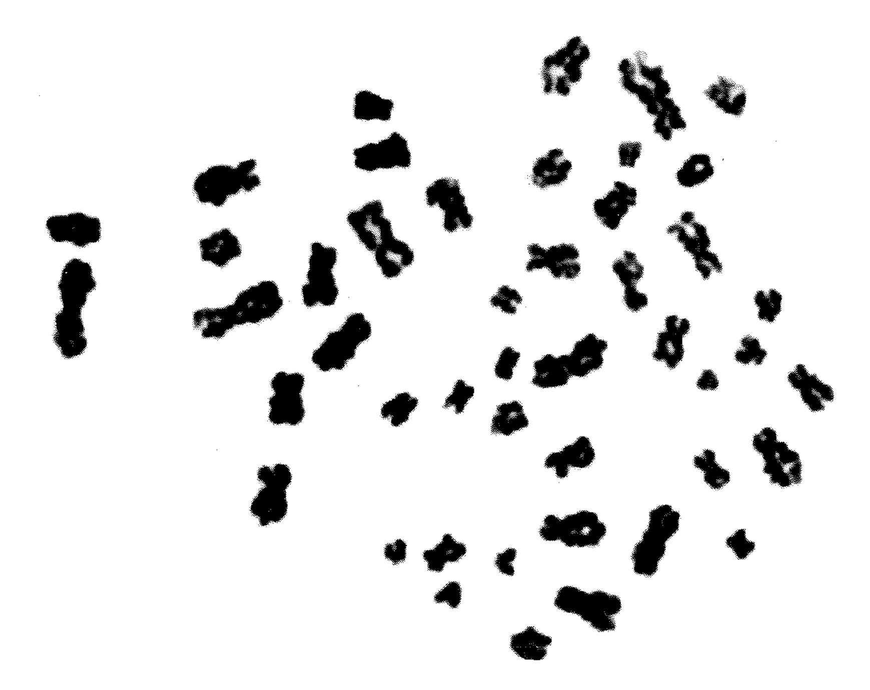


Fig. 3. – *Métaphase de spermatogonie. Coloration au Giemsa.*

Des maintiens sur coagulum ont été obtenus également (Dutrillaux, 1971) : avant toute dilacération, on prélève délicatement quelques segments de tubes séminifères que l'on dépose sur une lamelle couvre-objet où l'on a préalablement déposé une goutte de plasma de coq et une goutte d'extrait d'embryon de poulet.

On dilacère alors rapidement les tubes séminifères dans la goutte de plasma de coq, puis on retire les résidus de tubes vides. Les deux gouttes sont ensuite mélangées et étalées, et le coagulum qui se forme contient les cellules germinales répandues sur toute la surface de la lamelle.

Après coagulation, il suffit de placer la lamelle dans un tube contenant 2 cm^3 de milieu de Eagle. Les cellules peuvent être maintenues à 36 °C pendant plusieurs semaines. Les figures en division sont observées après choc hypotonique (30 mn.) et fixation habituelle, directement sur la lamelle avec le coagulum.

c) *Analyse de la méiose femelle.* — Très peu d'analyses de la méiose femelle ont été entreprises dans notre espèce. Ceci tient essentiellement aux

difficultés de prélèvement. Pour étudier les stades les plus précoces (jusqu'au dictyotène), il est nécessaire d'étudier des embryons ou des fœtus, après avortement. Pour étudier les stades ultérieurs, il faut, après biopsie ovarienne, récupérer les follicules en maturation, les disséquer afin de prélever les ovocytes qui seront placés dans du milieu physiologique à l'étuve, pendant 24-48 h selon le stade que l'on veut analyser. La rareté et la difficulté de telles manipulations, chez notre espèce, ne justifie donc pas une description détaillée dans un ouvrage d'intérêt général.

○



Techniques sur préparations fixées

Avant d'aborder la description des techniques de marquage les plus utilisées, nous rappelerons les techniques de coloration simples qui, généralement, n'induisent pas de marquage mais peuvent permettre d'en révéler un après divers traitements.

Techniques de coloration de base

a) *Coloration classique au Giemsa.* — C'était la coloration la plus largement utilisée avant la découverte des techniques de bandes. Actuellement, elle conserve son intérêt parce qu'elle donne une idée exacte de la morphologie générale des chromosomes. Par contre, elle n'en permet pas une étude fine. Elle est, par ailleurs, largement utilisée car elle permet la révélation du marquage induit par de nombreux traitements préalables.

☐ Technique. — La solution colorante est préparée extemporanément comme suit:

— eau distillée: 94 ml

— tampon phosphates M/15 à pH 6,7: 3 ml

— Giemsa R: 3 ml.

Cette solution est instable et doit être renouvelée après une heure. Les lames sont plongées dans la solution colorante pendant 10 minutes, puis sont rinçées abondamment à l'eau courante. Le séchage est spontané ou accéléré à l'air chaud.

☐ Résultats (fig. 4). — Les chromosomes apparaissent uniformément colorés, toutefois les régions hétérochromatiques (centromères, constrictions secondaires des 1, 9 et 16, bras courts des grands et petits acrocentriques, région distale du bras long de l'Y) prennent moins le colorant.

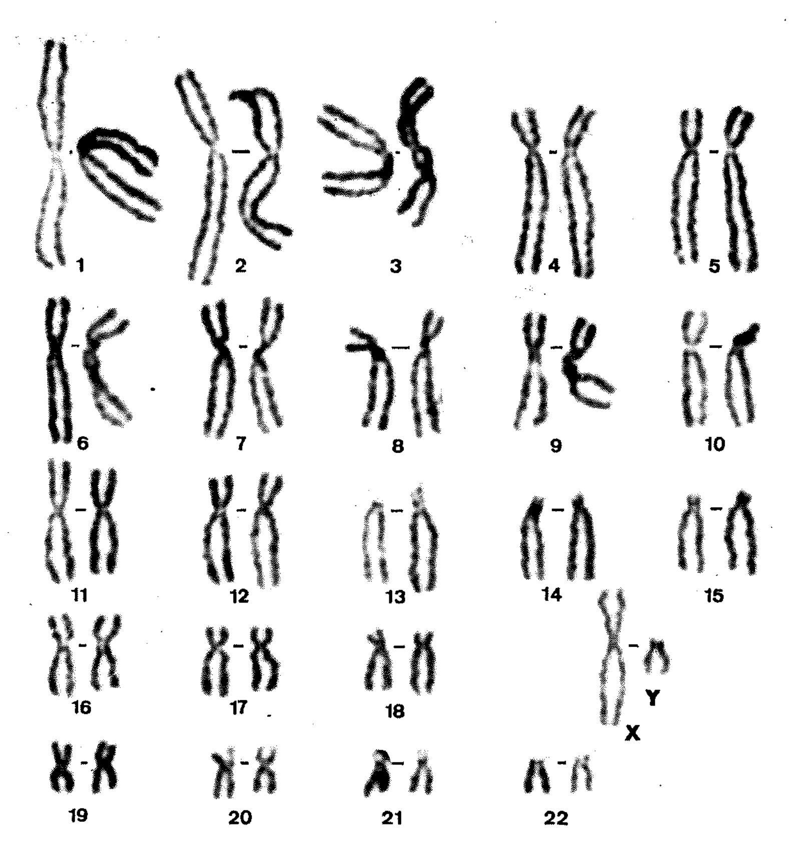


Fig. 4. — *Coloration au Giemsa. Caryotype masculin.*

b) *Coloration par l'acridine orange.* — Bien qu'ayant, dans des conditions particulières, une légère tendance à faire apparaître un marquage chromosomique, elle n'est pratiquement pas utilisée seule ; en effet, elle ne donne habituellement pas de renseignements supplémentaires par rapport à la coloration au Giemsa alors qu'étant une technique de fluorescence, elle est de mise en œuvre plus délicate. Par contre, par la métachromasie de fluorescence de l'acridine orange et sa bonne spécificité, cette coloration est une technique de choix pour révéler les marquages induits par certains traitements préalables.

☐ Technique (Couturier et coll. 1973). — Les lames sont tout d'abord hydratées par passage dans des alcools de titre dégressif : 90°, 70°, 50° (3

minutes dans chaque bac). Elles sont ensuite rincées à l'eau et plongées 20 minutes dans la solution colorante ainsi composée:

— acridine orange: 5 mg
— tampon phosphates M/15 pH 6,7: 100 ml.

Cette solution est très stable et se conserve au moins une semaine à la température ordinaire. L'utilisation d'une solution mère à 1 mg par ml d'eau distillée, stable pendant plusieurs mois, évite des pesées répétées. Les lames sont ensuite rinçées abondamment à l'eau courante; des lames insuffisamment rinçées présenteront une dominante rouge à l'examen. Elles sont enfin montées dans le tampon pH 6,7 et recouvertes d'une lamelle.

L'examen se fait au microscope en fluorescence. Le pic d'absorption de l'acridine orange se situe aux environs de 470 nm; il existe deux pics d'émission: l'un à 530 nm, l'autre à 650 nm. On peut employer des combinaisons de filtres d'excitation et d'arrêt soit avec verres colorés soit avec filtres interférentiels:

Type de filtres	*Excitation*	*Arrêt*
Verre coloré	BG 12	50 + 65
Interférentiel	BP 450-490	BP 520-560

(dénominations allemandes).

Plus amples indications pratiques sur la microscopie de fluorecence seront données plus loin.

☐ Résultats. — Les chromosomes présentent une fluorescence homogène jaune-vert. Comme nous l'avons dit, cette technique, employée seule, ne présente pas d'intérêt en pratique, mais sera utilisée pour certaines techniques de marquage. Par ailleurs, appliquée sur des noyaux interphasiques, cette coloration permet de mettre en évidence les nucléoles (fluorescence rouge) et le corpuscule de Barr dans les cellules femelles (jaune-vert brillant).

c) *Coloration de Feulgen.* — La coloration de Feulgen n'est pas utilisée de façon courante en cytogénétique: elle est en effet de mise en œuvre relativement complexe et ne donne pas, pour la simple coloration des chromosomes, des résultats supérieurs aux colorants moins spécifiques dont nous venons de parler. Par contre, sa spécificité pour l'ADN (d'ailleurs discutée) fait qu'elle peut être intéressante dans des cas particuliers quand on veut détecter électivement cet acide nucléique, ou en faire une analyse quantitative par spectrophotométrie.

☐ Principe. — Cette réaction comporte plusieurs étapes.

En premier lieu, une hydrolyse acide sépare de l'ADN les bases puriques, aboutissant à un acide apurinique. Dans un second temps, les groupements aldhéhydes du désoxyribose, libérés, vont réagir avec la fuchsine de Schiff décolorée, donnant un composé de couleur magenta caractéristique.

☐ Réalisation. — La fixation au Carnoy convenant pour la réaction de Feulgen, on peut utiliser des lames préparées selon les méthodes habituelles. Hydrolyser par HCl N, à 60 °C pendant 8 minutes. Rinçer à l'eau distillée. Colorer dans le réactif de Schiff pendant 2 heures. Sécher. Passer dans 3 bains successifs, de 5 minutes chacun, de solution sulfureuse fraîchement préparée ainsi :

— métabisulfite de potassium à 10 % : 5 ml

— eau distillée : 100 ml

Rinçer à l'eau distillée. Laisser sécher.

☐ Résultats. — L'ADN est coloré en rose-rouge (magenta).

d) *Autres colorations.* — De nombreux colorants ont été employés pour les chromosomes. Il convient de dire que, depuis la mise au point des techniques de marquage, la plupart de ces techniques de coloration ont perdu beaucoup de leur intérêt et ont été supplantés par le Giemsa qui est d'utilisation très simple et qui donne des images contrastées. L'orcéine a été l'un des colorants les plus utilisés. Nous en décrirons briévement le mode d'emploi. Les lames sont recouvertes de la solution colorante préparée comme suit :

Mélanger :

— Orcéine : 1 g

— Acide acétique pur : 45 ml.

Dissoudre en chauffant, laisser refroidir et ajouter 55 ml d'eau distillée. Filtrer.

Les préparations sont rinçées à l'eau distillée et séchées. Les chromosomes apparaissent colorés en rouge pourpre foncé.

Hybridation *in situ* et autoradiographie

a) *Hybridation* in situ. — Bien que cette technique ne soit pas, à l'heure actuelle, de pratique courante dans les laboratoires de cytogénétique, il nous a paru utile de la mentionner, compte tenu de l'importance qu'elle sera probablement amenée à prendre dans l'avenir. Toutefois, il n'est pas possible de décrire ici les méthodes d'extraction de l'ADN et de préparation des sondes radioactives.

Dans son principe, cette technique consiste, en un premier temps, à former des duplex ARN - ADN ou ADN - ADN par hybridation de segments marqués d'ARN ou d'ADN monocatenaire de nature connue, sur l'ADN chromosomique (*in situ*). Dans un second temps, les sites d'hybridation sont révélés sur les préparations chromosomiques par autoradiographie.

☐ Références. — Elles sont très nombreuses et varient avec le matériel étudié mais la plupart des techniques actuellement employées sont dérivées de la technique originale de Gall et Pardue (1971); citons: Saunders et coll. (1972), Jones (1973), Sanchez et Yunis (1974), Pardue et Gall (1975), Gosden et coll. (1975), Steffensen (1977).

☐ Technique

— Préparations chromosomiques: d'une façon générale, il n'est pas nécessaire d'employer des méthodes de fixation particulières pour les préparations destinées à l'hybridation *in situ*. On utilisera seulement de préférence des lames fraîches. Des techniques de marquage non agressives pour la structure chromosomique, comme une coloration par la moutarde de quinacrine ou par l'acridine orange après incorporation de BrdU*, peuvent être effectuées avant l'hybridation pour permettre une bonne reconnaissance des chromosomes. Le colorant est éliminé ensuite par rinçage prolongé à l'eau courante. Le séchage se fait spontanément à l'air.

— Élimination de l'ARN: l'ARN cellulaire risquant d'entrer en compétition avec la sonde marquée est éliminé par un traitement des lames par la RN-ase (100 μg/ml) pendant une heure à 37 °C. Cette étape est fréquemment omise; en particulier, elle n'est pas nécessaire lorsque l'on étudie des séquences d'ADN satellites puisque celles-ci ne sont pas transcrites.

— Élimination des protéines et dénaturation de l'ADN chromosomique: les méthodes de dénaturation varient beaucoup selon les auteurs. Essentiellement, trois types de procédés sont employés: traitement alcalin par NaOH 0,07 N pendant 2 minutes à la température ambiante (Gall et Pardue, 1971), traitement acide par HCl 0,2 N pendant 30 minutes à la température ambiante ou traitement par une solution SSC-formamide** à haute température (Sanchez et Yunis, 1974). De toutes ces méthodes, il semble que ce soit le traiment acide par HCl 0,2 N qui donne les meilleurs résultats cytologiques après recoloration des chromosomes. Les lames sont ensuite rapidement déshydratées par passage dans des bains d'éthanol à 50°, 70°, 90° et absolu, et enfin séchés à l'air. Variante pour les chromosomes ayant incorporé du BrdU: il est possible de dénaturer spécifiquement les segments chromosomiques ayant incorporé le BrdU en effectuant tout d'abord une coloration par l'acridine orange, puis une irradiation ultra-violette sous le microscope (permettant de repérer et de photographier les mitoses), enfin une dénaturation thermique (30 à 60 secondes dans la solution de Earle, pH 6,5, à 87 °C). Les préparations sont ensuite déshydratées comme ci-dessus (Couturier et coll., 1981).

* BrdU: 5-Bromodéoxyuridine.

** SSC: NaCl 0,15 M, citrate trisodique 0,015 M.

— Hybridation: 40 μl de la solution contenant la sonde marquée diluée dans SSC X 2 sont déposés sur chaque lame. Si cette sonde est un ADN, elle est dénaturée au préalable par incubation au bain marie à 100 °C pendant 5 minutes. Il est difficile de donner une indication précise quand à la concentration de la sonde, celle-ci pouvant être très variable selon son activité spécifique, la séquence étudiée etc... Gall et Pardue (1971) considèrent que l'activité minimum utilisable est de 10^5 cpm/μg. Les concentrations habituellement utilisées sont de l'ordre de 0,1 à 1 μg/ml. Certains auteurs (Steffensen, 1977, Mac Gregor et Mizuno, 1976) recommandent la présence, dans la solution d'hybridation, de 30 à 50 % de formamide.

La lame est recouverte d'une lamelle (22 x 22 mm) et mise à incuber en chambre humide pendant en général, 15 heures. Cette durée peut varier elle aussi en fonction des sondes utilisées. La détermination de cette durée était, jusqu'à il y a peu de temps, empirique, mais la cinétique de l'hybridation est maintenant mieux connue (Szabo et coll. 1975). Après hybridation, la lamelle est retirée et la lame abondamment rincée au SSC X 2 à 65 °C, puis déshydratée par passage dans les alcools de titre croissant. Dans le cas d'hybridation avec de l'ARN, il est nécessaire, avant déshydratation, de passer par une étape d'élimination des complexes non spécifiques par traitement de la lame à la RNase (20 μg/ml en SSC X 2, pendant une heure à 37 °C).

b) *Autoradiographie.* — La méthode que nous décrivons s'applique aussi bien à l'hybridation *in situ* qu'aux techniques d'incorporation de précurseurs radioactifs (thymidine tritiée, par exemple).

☐ L'émulsion. — Il existe deux sortes d'émulsions: les «stripping films» (type KODAK AR 10) et les émulsions liquides (type KODAK NTB). Le «stripping film» présente l'avantage d'avoir une épaisseur constante (5 μ), de bien se prêter aux études quantitatives, et de pouvoir être utilisé au fur et à mesure des besoins. Son montage sur la lame est, par contre, assez délicat. L'émulsion liquide a plusieurs avantages: par dilution, on peut régler son épaisseur et obtenir ainsi des couches plus fines qu'avec le «stripping film». Le contact entre le film et la préparation est plus intime qu'avec le «stripping film». Le revêtement de la lame est aussi plus rapide par l'émulsion liquide. Par contre, la conservation de celle-ci est limitée et de grandes précautions doivent être prises pour éviter la contamination.

☐ Réalisation des préparations autoradiographiques. — Nous décrirons ici le mode d'emploi de l'émulsion liquide, dont l'utilisation tend à se généraliser. Le maniement de l'émulsion (par exemple, KODAK NTB) doit être fait sous éclairage inactinique (lampe 15 watts avec filtre KODAK n° 2, placée au moins à 1,20 m).

La bouteille est placée au bain-marie à 45 °C jusqu'à liquéfaction complète (45 minutes environ). L'émulsion est en général utilisée diluée à 50 p. 100 dans l'eau distillée. Prendre soin d'homogénéiser très doucement afin d'éviter la formation de bulles d'air. Replacer au bain-marie. Les lames sont

plongées une à une, sorties rapidement, égouttées, puis laissées à sécher. Lorsqu'elles sont presque sèches, elles sont placées dans des portoirs dans une chambre noire traversée par un courant d'air durant une quinzaine d'heures, pour achever la dessication. Elles sont ensuite placées dans des boîtes étanches à la lumière contenant un dessicant et mises à + 4 °C. La durée de l'exposition varie bien entendu selon les expériences. Dans la pratique, on réalise dans les mêmes conditions plusieurs préparations qui seront développées à des temps différents (par exemple, de 3 jours à plusieurs semaines).

☐ Traitement

Développement: KODAK D 19 (dilution 1: 1) 4 mn. à 15 °C sans agitation.

Arrêt: Immersion de 30 secondes dans un bain d'eau distillée.

Fixation: KODAK Unifix (dilution 1: 3) 5 mn.

Rinçage à l'eau courante pendant 5 mn.

Passer à l'eau distillée et laisser sécher spontanément à l'air.

☐ Coloration. — Elle constitue un problème délicat, en particulier dans le cas de l'hybridation *in situ*. En effet, la morphologie chromosomique est souvent très altérée par les traitements subis pour l'hybridation et pour le développement de l'émulsion. Par ailleurs, la coloration a lieu à travers celle-ci, laquelle prend elle-même plus ou moins le colorant. De très nombreux colorants ont été proposés pour l'autoradiographie. Le plus courant reste le Giemsa. La coloration est faite pendant 20 minutes, dans une solution composée ainsi:

— Giemsa 10 ml

— Tampon phosphates pH 6,7 M/15 = 10 ml

— Eau distillée: 80 ml.

La lame est abondamment rincée à l'eau courante et laissée à sécher spontanément à l'air.

Les mitoses préalablement repérées sont photographiées à nouveau. Il est souvent possible, après observation, d'enlever l'émulsion sans altérer les préparations chromosomiques. Pour cela, on dégraisse la lame au toluène puis, après séchage, on l'immerge pendant un temps prolongé dans un bac d'eau distillée. L'émulsion gonfle, puis tend à se décoller de la lame; il ne reste qu'à l'enlever prudemment à la pince.

Techniques de marquage

Les techniques de marquage correspondent à l'ensemble des procédés permettant de mettre en évidence des structures, appelées bandes, sur les chromosomes mitotiques ou méiotiques. Ces procédés sont très divers, et il est difficile de les décrire selon un plan entièrement rationnel.

La première méthode fut basée sur une coloration spécifique et une observation de la fluorescence émise par les chromosomes, après irradiation ultra-violette.

Un second groupe de méthodes découla du traitement thermique, en milieu salin, des préparations, suivi d'une coloration par le Giemsa et d'une observation classique.

Un troisième procédé consiste à faire une digestion enzymatique des chromosomes, suivie d'une coloration au Giemsa.

Enfin, un dernier groupe de techniques consiste à modifier le chromosome dans la cellule vivante, par incorporation d'un analogue d'une base de l'ADN, par exemple, et à observer les conséquences sur la condensation chromosomique.

Tous ces procédés reposent sur des principes biochimiques divers, faisant intervenir les différents composants chromosomiques, ADN et protéines, ainsi que la dynamique de la réplication de l'ADN, et de la condensation des chromatides.

Les structures mises en évidence par ces méthodes on été dûment répertoriées et classifiées. Leur nomenclature sera envisagée au chapitre 6. Toutefois, précisons dès maintenant qu'il existe 3 types principaux de marquage:

- deux pour l'euchromatine, c'est-à-dire les segments non variables représentant chez la plupart des espèces la quasi-totalité de la longueur des chromatides. Ce sont, d'une part les bandes Q et G, de même localisation, et qui colorent environ 50 p. 100 de l'euchromatine, et d'autre part les bandes R qui colorent le reste. L'euchromatine est donc constituée de l'alternance des bandes Q ou G et R.

- un pour l'hétérochromatine, qui correspond chez la plupart des mammifères au marquage C, localisé le plus souvent aux régions centrométriques. Il existe toutefois de nombreuses exceptions, et de nombreuses variétés de coloration de l'hétérochromatine.

Marquage de l'euchromatine

a) *Bandes Q (Quinacrine).*

☐ Référence. — Caspersson et coll. (1970).

☐ Technique. — Elle est voisine de celle utilisée pour l'acridine orange.

Les lames sont passées dans des bains successifs d'éthanol de titre dégressif, rinçées à l'eau distillée, puis plongées pendant 5 minutes dans un bain de tampon phosphates pH 6,7. La coloration est faite dans une solution de moutarde de quinacrine à raison de 5 mg/100 ml dans de l'eau distillée, durant 20 minutes. Les lames sont rinçées par passage dans un nouveau bain de tampon phosphates et montées avec une lamelle dans le même tampon.

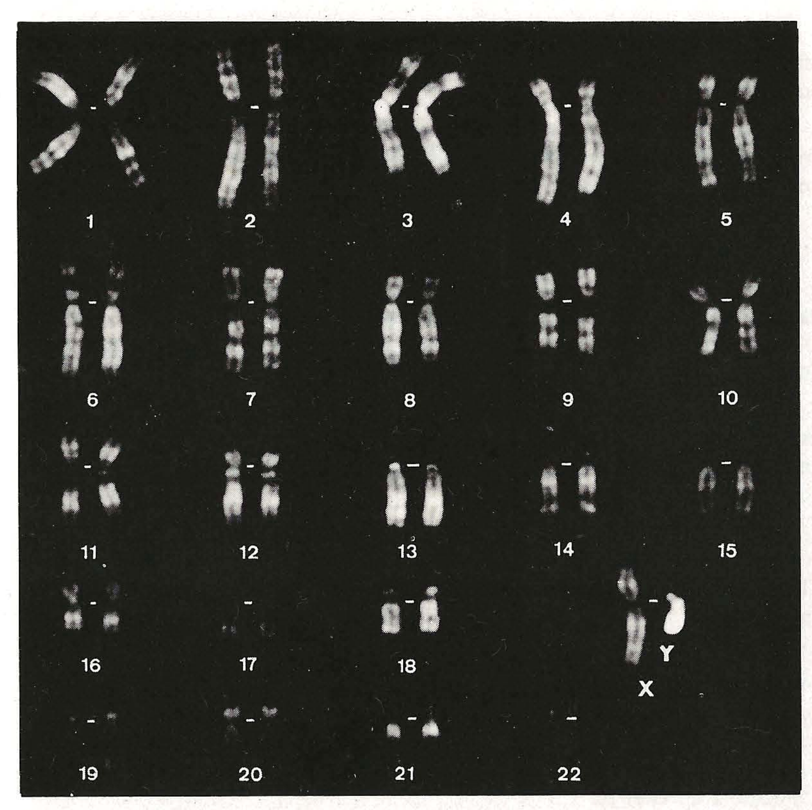


Fig. 5. — *Coloration par la moutarde de quinacrine (bandes Q). Caryotype masculin.*

Remarquer la fluorescence particulièrement intense du bras long de l'Y et de certaines autres régions hétérochromatiques comme la région péricentromérique du 3.

L'observation est faite au microscope en fluorescence. Le pic d'absorption de la quinacrine s'étale de 430 à 460 nm, le pic d'émission de 480 à 530 nm, environ. Les combinaisons de filtres employées sont les suivantes:

Type de filtres	*Excitation*	*Arrêt*
Verre coloré	BG 12	50
Interférentiel	BP 436/8	LP 475

☐ Résultats (fig. 5). — Les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et brillantes dont la séquence est spécifique d'une paire donnée. Les constrictions secondaires sont sombres. Certaines régions hétérochromatiques sont très brillantes: région centromérique du 3, parfois du 4, du 13, certains bras courts d'acrocentriques et surtout la région distale du bras long de l'Y. Ces marqueurs sont le siège de variations physiologiques

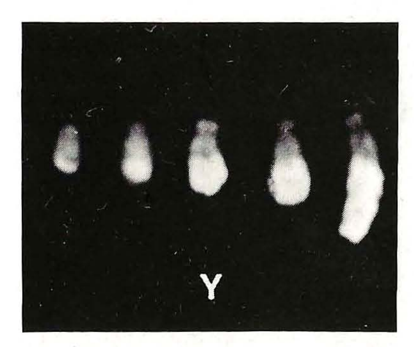


Fig. 6. — *Variations normales de l'Y (bandes Q).*

Les différences de longueur de l'Y selon les individus sont dues à des variations de la région fluorescente du bras long.

(fig. 6). La coloration à la moutarde de quinacrine est d'un grand intérêt pour leur étude. La fluorescence du bras long de l'Y est souvent tellement intense qu'elle peut être reconnue même sur des noyaux interphasiques (frottis buccaux, fibroblastes, cellules ammiotiques, spermatozoïdes). On devra cependant se méfier de la possibilité de faux positifs du fait de l'existence de marqueurs automosiques eux-mêmes très fluorescents.

b) *Bandes G (Giemsa)*

☐ Références. — Elles sont très nombreuses, nous ne détaillerons que les techniques les plus utilisées actuellement.

— Méthodes de «dénaturation»: Sumner et coll. (1971), Schnedl (1971).

— Méthodes protéolytiques: Dutrillaux et coll. (1971), Seabright (1971).

☐ Techniques

— ASG (Acetic, Saline, Giemsa) [Summer et coll. (1971)]. Incuber les lames dans une solution de SSC X 2 (NaCl 0,3 M, citrate trisodique 0,03 M) pendant une heure à 60 °C. Rincer à l'eau distillée et colorer 1 heure 30 dans une solution de Giemsa à 2 % tamponnée à pH 6,8.

— Trypsine (Seabright, 1971). Plusieurs auteurs ont proposé, depuis, de légères modifications de cette technique protéolytique, mais le principe demeure le même. On prépare une solution de trypsine à 0,25 % (trypsine 1 : 250 Difco) dans du NaCl isotonique ou, mieux, dans du PBS modifié, sans calcium ni magnésium :

NaCl :	8 000 mg/l
KCl :	200 mg/l
$Na_2HPO_4, 2H_2O$:	1 440 mg/l
KH_2PO_4 :	200 mg/l

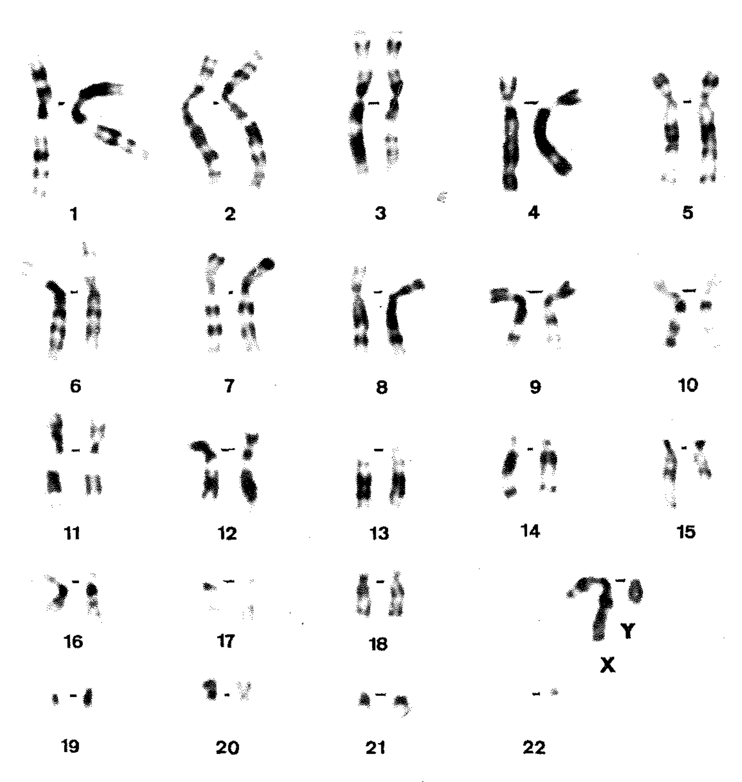


Fig. 7. — *Bandes G. Coloration au Giemsa. Caryotype masculin.*

Les lames sont plongées pendant 10 à 45 secondes dans cette solution, à la température ambiante, rinçées au NaCl isotonique ou au PBS et colorées au Giemsa. Cette technique protéolytique est l'une des méthodes de marquage les plus employées actuellement.

☐ Résutats (fig. 7). — Les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires dont la topographie est identique à celle des bandes Q: les bandes colorées sont celles qui étaient très brillantes avec la moutarde de quinacrine. Cependant, des différences existent au niveau des régions hétérochromatiques.

c) *Bandes R (Reverse)*

☐ Références. — Dutrillaux et Lejeune (1971), Carpentier et coll. (1972), Dutrillaux et Covic (1974), Sehested (1974), Verma et Lubs (1975).

☐ Technique. — Interprétée comme une dénaturation ménagée des chromosomes, la technique décrite par Dutrillaux et Covic (1974) et Dutrillaux (1975 a) consiste à traiter les préparations dans un milieu physiologique
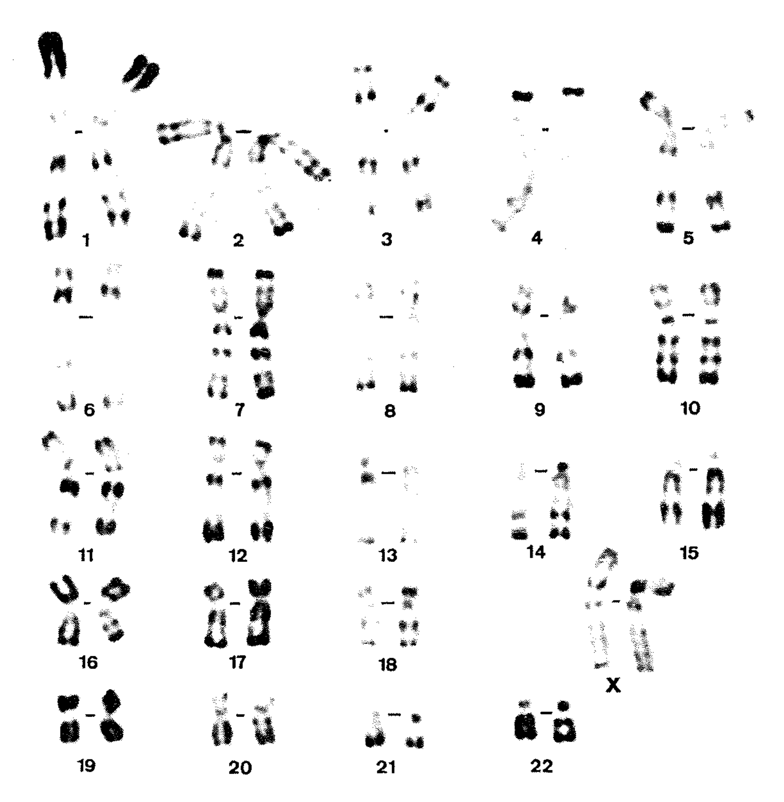


Fig. 8. – *Bandes R. Coloration au Giemsa. Caryotype féminin.*

(initialement, un tampon phosphates) à pH 6,5, à 87 °C. Elle est particulièrement adaptée à une utilisation de routine.

On prépare tout d'abord une solution de Earle sans bicarbonate à partir des sels ou des milieux concentrés du commerce, ou bien par pesées. Nous donnons ici la composition de cette solution.

NaCl:	6 800 mg/l
KCl:	400 mg/l
$NaH_2 PO_4$, H_20:	140 mg/l
$MgSO_4$, 7 H_20:	200 mg/l
glucose:	1 000 mg/l
$CaCl_2$:	200 mg/l

Cette solution, de pH voisin de 5,2, est ajustée à pH 6,5, sous pH-mètre, par addition de cristaux de $Na_2H\ PO_4$. Des bacs en porcelaine d'une conte-

nance de 100 ml sont remplis de cette solution et mis au bain-marie à 87 °C. La température est un paramètre critique de la technique : le bain-marie doit comporter une turbine d'agitation et pouvoir maintenir la température à un degré près. Les lames sont plongées dans la solution pendant des temps variables selon leur fraîcheur : des préparations étalées le jour-même seront traitées entre 1 et 2 heures, des préparations de 8 jours, entre 15 et 45 minutes. A la fin du traitement, les préparations sont rapidement rincées à l'eau courante et colorées au Giemsa. L'observation microscopique au fort grossissement et la photographie sont faites en contraste de phase, avec un filtre orange, la coloration étant en effet normalement assez pâle.

☐ Résultats (fig. 8). — Les chromosomes présentent une alternance de bandes sombres et claires dont la topographie est réciproque de celle des bandes Q ou G : les bandes colorées sont celles qui étaient sombres avec la moutarde de quinacrine.

Un aspect général trop coloré, entraînant l'apparition de points réfringents en contraste de phase, est le témoin d'un traitement thermique insuffisant. Il est possible, dans ce cas, après dégraissage au toluène, de replonger la lame dans le bain de dénaturation (sans décoloration) pour prolonger le traitement. La coloration habituelle est ensuite à nouveau effectuée. Inversement, des chromosomes très pâles, ne présentant que peu de bandes indiquent un traitement trop prolongé.

Au lieu d'employer le Giemsa, il est possible d'effectuer une coloration à l'acridine orange et d'observer les préparations en fluorescence (Bobrow et coll., 1972a ; Verma et Lubs, 1975). Pour ce faire, les lames sortant du bain de dénaturation sont directement plongées, après un bref rinçage à l'eau distillée, dans la solution d'acridine (cf p. 25). Les bandes R apparaissent de couleur jaune-vert, les bandes G rouge sombre. En règle générale, ce procédé ne présente pas de supériorité par rapport à la coloration habituelle au Giemsa. Par contre, il peut permettre d'obtenir un meilleur résultat lorsque le contraste est faible du fait d'un traitement thermique trop prolongé. Dans ce cas, la lame colorée au Giemsa est dégraissée au toluène, puis décolorée par immersion durant une quinzaine de minutes dans l'alcool 70°, rinçée à l'eau distillée et plongée dans la solution d'acridine.

d) *Bandes T (Terminales)*

☐ Référence. — Dutrillaux (1973).

☐ Technique. — Elle est dérivée de la technique des bandes R. Elle permet de caractériser certaines de ces bandes, particulièrement résistantes à la dénaturation.

Les préparations sont plongées dans une solution de Earle sans bicarbonate, non ajustée (soit à pH voisin de 5,2), à 87 °C.

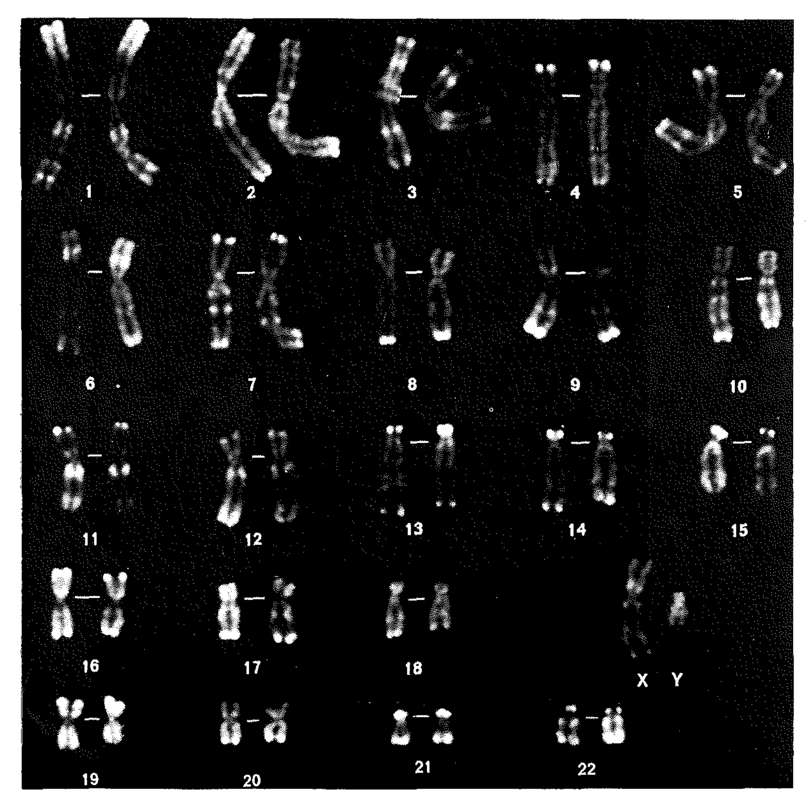


Fig. 9. — *Bandes T. Coloration à l'acridine orange.*

Remarquer les variations normales dans la longueur et dans la fluorescence des bras courts des chromosomes acrocentriques.

Ici aussi, la durée du traitement thermique est variable avec l'âge des lames. Il est à peu près du même ordre que pour les bandes R. Après rinçage à l'eau courante les lames peuvent être soit colorées simplement au Giemsa, soit, mieux, colorées à l'acridine orange et observées en lumière ultra-violette. Dans ce cas, on omet l'étape de la réhydratation par les alcools.

☐ Résultats (fig. 9). — Après Giemsa, en contraste de phase, les mitoses apparaissent très pâles et les chromosomes présentent seulement quelques bandes colorées, situées, pour la plupart, à leurs extrémités. Particulièrement marquées, par exemple, sont les extrémités du bras court des 4, 7, du bras long des 8, 9, 17... Quelques bras courts d'acrocentriques peuvent être aussi intensément colorés: il s'agit de segments dont les variations sont sans incidence pathologique.

Après coloration à l'acridine orange, le contraste est particulièrement bon : les bandes T, jaune-brillant, se détachent sur le reste des chromatides rouge-sombre.

Si le traitement thermique est insuffisant, les chromosomes apparaissent trop colorés et un grand nombre de bandes R persistent.

Pour ce marquage, comme pour les bandes R, il semble que les préparations obtenues après choc hypotonique au sérum dilué, décrit plus haut, donnent les meilleurs résultats.

Coloration de l'hétérochromatine

Nous préférons citer à part ces techniques qui mettent en évidence des structures que l'on ne peut intégrer dans les deux grands systèmes de bandes : Q (ou G) et R.

a) *Bandes C (Centromère).* — Coloration de l'hétérochromatine constitutive.

☐ Références. — Elles sont assez nombreuses ; citons : Arrighi et Hsu (1971), Craig-Holmes et Shaw (1971) Yunis et coll. (1971) Summer (1972).

☐ Technique. — Celle que nous décrivons est une légère modification de celle de Sumner et donne des résultats réguliers.

Les lames sont plongées dans HCl 0,2N pendant une heure à la température ambiante, rincées à l'eau distillée et traitées pendant 30 secondes à une minute dans une solution d'hydroxyde de baryum 0,3N à 50 °C. Elles sont rincées à l'eau distillée puis plongées dans une solution de SSC X 2 (NaCl 0,3 M, citrate trisodique 0,03 M) à 60 °C pendant une heure. Après un nouveau rinçage à l'eau distillée, les lames sont colorées au Giemsa pendant 5 minutes.

☐ Résultats (fig. 10). — Les chromatides sont uniformément pâles (l'observation est de préférence faite en contraste de phase), seules apparaissent fortement colorées les régions centromériques, les constrictions secondaires et la partie distale du bras long de l'Y.

Des chromatides trop colorées et, par conséquent, un mauvais contraste des bandes C, indiquent un traitement insuffisant par l'hydroxyde de baryum. Il y a lieu de le prolonger de 30 secondes environ. Inversement, des chromosomes très pâles, pratiquement sans marquage, indiquent un traitement trop long par l'hydroxyde de baryum.

b) *Bandes CT*

☐ Référence. — Scheres (1976).

☐ Technique. — Les lames sont placées dans une solution saturée de Ba $(OH)_2$ à 60 °C pendant 10 minutes. Elles sont rincées à l'eau distillée puis mises à incuber dans une solution de SSC X 2 à 60 °C pendant 30 minutes.



Fig. 10. – *Bandes C. Coloration au Giemsa.*

Après rinçage à l'eau distillée, les lames sont colorées pendant 10 minutes dans une solution à 0,005 p. 100 de «Stains all» Serva (4,5, 4', 5' -dibenzo-3,3'- diethyl -9 - methyl - thiacarbocyanine - bromide) dans un mélange 1 : 1 formamide - eau. Elles sont enfin rincées à l'eau distillée et séchées.

☐ Résultats. — Les bandes C et les bandes T sont colorées simultanément.

c) *Coloration de régions portant certains types d'ADN satellite* (constriction secondaire du 9, en particulier)

☐ Références. — Gagné et Laberge (1972), Bobrow et coll. (1972b).

☐ Technique. — Les deux techniques sont très voisines. Celle de Bobrow est la plus simple et consiste à colorer les lames pendant 8 minutes dans une solution de Giemsa à 2 p. 100 amenée à pH 11 par addition de

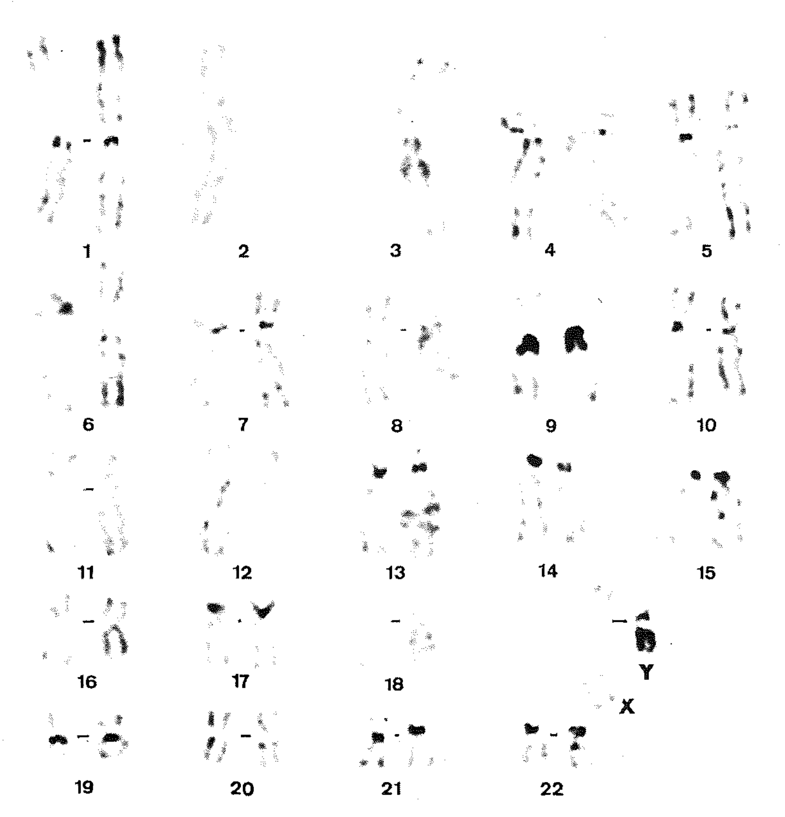


Fig. 11. — *Technique de coloration de la constriction secondaire du 9.*

Remarquer aussi la coloration d'autres régions hétérochromatiques : bras long de l'Y, bras courts d'acrocentriques, etc...

soude. Dans celle de Gagné et Laberge, la solution de Giemsa à 2 p. 100 est faite dans une solution à 0,1 p. 100 de $Na_2\ HPO_4$, 12 H_2O réglée à pH 11,6 par addition de soude. Les lames sont colorées dans cette solution pendant 5 minutes.

☐ Résultats (fig. 11). — Cette technique, qui colore fortement la constriction secondaire du chromosome 9, colore également d'autres régions hétérochromatiques : bras courts des acrocentriques, région distale du bras long de l'Y, région centrométrique des chromosomes 1, 5, 7, 10, 17 et 19.

d) *Coloration de certaines régions hétérochromatiques par le DA-DAPI.* — Un grand nombre de fluorochromes ou d'antibiotiques (33258 Hoechst, Actinomycine D, Chromomycine, Olivomycine, Netropsine, Daunomycine, Mithramycine...), supposés avoir des affinités particulières pour certaines

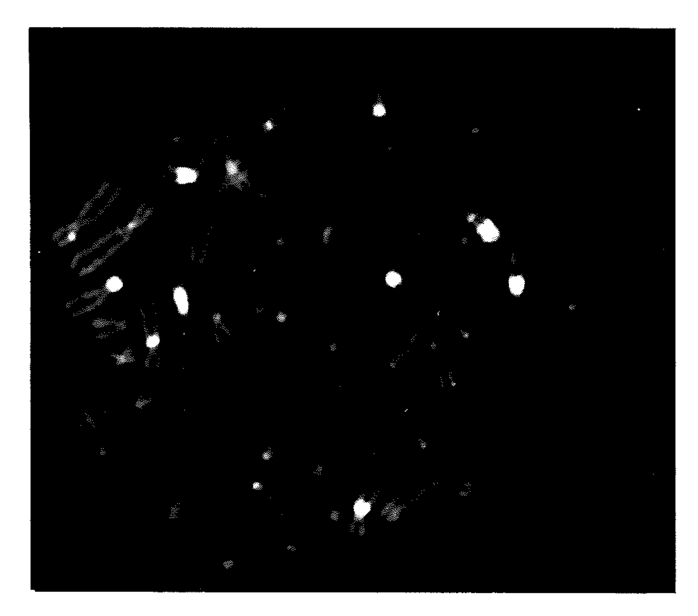


Fig. 12. — *Coloration au DA-DAPI.*

Cellule masculine (Dr B. Noël. Centre départemental de transfusion sanguine, Chambéry).

séquences de bases du DNA ou avoir des rendements de fluorescence différents selon ces séquences, ont été testés sur des préparations chromosomiques. Les résultats de ces expériences ne sont pas univoques et ont permis jusqu'à présent peu d'applications pratiques. Il n'est pas possible de les détailler dans un ouvrage de base. Nous ne décrivons ici que la technique de coloration à la Distamycine A et au 4'-6- Di-Amidino-2-Phenyl-Indole (DA-DAPI) qui est relativement facile à mettre en œuvre et qui peut, par exemple, permettre d'affirmer la nature hétérochromatique de certains segments chromosomiques paraissant, au premier abord, être en excès.

☐ Référence. — Schweizer et coll. (1978).

☐ Technique. — Les préparations sont colorées par une solution de distamycine A-HCl à 0,2 mg/ml en tampon Mac Ilvaine à pH 7 (0,33 M Na+) pendant 15 minutes. Elles sont rincées avec le même tampon et colorées à nouveau avec la solution de DAPI à 0,4 μg/ml dans ce tampon pH 7 pendant 15 minutes. Un rinçage est alors fait avec ce tampon puis avec un tampon pH 7,5. La lame est enfin montée avec une lamelle en tampon pH 7,5. L'excès de tampon est enlevé par pression entre deux feuilles de papier filtre. L'observation est faite en lumière ultraviolette. Le pic d'absorption du complexe DNA-DAPI (seul composé des deux à être fluorescent) se situe à 355 nm et le pic

d'émission à 450 nm; le choix des filtres d'excitation et d'arrêt doit être fait en conséquence. La principale difficulté de la technique réside dans l'extinction rapide de la fluorescence pendant l'irradiation UV. Celle-ci semble atténuée par un séjour des lames d'une quinzaine d'heures au réfrigérateur après la coloration. Ce fait a été observé aussi pour d'autres fluorochromes.

☐ Résultats. — Les chromatides sont, dans l'ensemble, très peu fluorescentes, par contre les régions hétérochromatiques des 1, 9 et 16, le bras court du 15 et la région distale de l'Y sont très brillants (fig. 12). Certains centromères sont aussi relativement fluorescents. Après irradiation prolongée, les régions brillantes tendent à s'effacer et apparaît un marquage de type Q interprété comme étant lié à la fluorescence propre du DAPI.

e) *Coloration des régions porteuses des organisateurs nucléolaires (NOR).* — Ces régions peuvent être mises en évidence, par deux types de méthodes: méthodes de «dénaturation» (bandes N) et méthode de précipitation argentique.

— Bandes N

☐ Référence. — Funaki et coll. (1975).

☐ Technique. — La technique initiale faisant intervenir en traitement des préparations par l'acide trichloracétique et l'acide chlorhydrique, à chaud, a été modifiée. Celle que nous décrivons ci-dessous donne, d'après les auteurs, de meilleurs résultats.

Les lames sont incubées à 96 °C dans une solution molaire de $Na\,H_2\,PO_4$ ajustée à pH 4,2 avec de la soude normale, pendant 15 minutes. Elles sont ensuite abondamment rincées à l'eau distillée et colorées pendant 20 minutes dans une solution de Giemsa à 4 p. 100 dans du tampon phosphates 1/15 M à pH 7. Elles sont enfin rincées à l'eau courante et séchées à l'air.

☐ Résultats. — Les chromatides sont dans l'ensemble, assez pâles; seules sont colorées les régions porteuses de l'ADN ribosomique (chez l'homme, les bras courts des acrocentriques), quoique la technique colore plus probablement des protéines chromosomiques que l'ADN.

— Coloration par le nitrate d'argent:

☐ Référence. — Bloom et Goodpasture (1976).

☐ Technique. — Deux méthodes peuvent être employées, l'une est directe, l'autre, suivie d'une étape de révélation.

Technique directe: elle présente l'avantage d'être plus simple, de donner une coloration plus homogène sur la lame; par contre, le contraste est souvent faible. Elle consiste simplement à recouvrir les lames avec une solution de nitrate d'argent à 50 p. 100 dans l'eau distillée. Couvrir par une lamelle et mettre en chambre humide, pour éviter la dessication, durant 4 heures à 50 °C ou 15 heures à 37 °C. Au bout de ce temps, les lames sont rinçées à l'eau distillée, séchées et peuvent être observées. Si le contraste des chro-

mosomes est faible, il est possible de faire une coloration au Giemsa à 2 p. 100 pendant 15 secondes.

Technique avec révélation : trois solutions doivent être préparées au préalable :

— solution d'$AgNO_3$ à 50 p. 100 dans l'eau distillée

— solution de nitrate d'argent ammoniacal :

$AgNO_3$:	4 g
Eau distillée :	5 ml
NH_4OH à 28 p. 100 :	5 ml

Agiter jusqu'à disparition du précipité.

— solution de formol :



Fig. 13. — *Mise en évidence des régions porteuses des organisateurs nucléolaires (NOR). Coloration à l'argent.*

Préparer une solution de formol à 3 p. 100 (3 ml de solution de formaldéhyde à 30 p. 100 dans 97 ml d'eau distillée). Amener à pH 7, sous pH-mètre, par addition de cristaux d'acétate de sodium, puis ajuster à pH 4,5 par quelques gouttes d'acide formique.

Les lames sont recouvertes de la solution d'$AgNO_3$ à 50 p. 100 et d'une lamelle et mises à incuber 15 minutes à 50 °C, en chambre humide. Elles sont ensuite rincées à l'eau distillée et séchées. Puis, chaque lame est recouverte de 4 gouttes de la solution de nitrate d'argent ammoniacial et de la même quantité de formol. On recouvre d'une lamelle. L'évolution de la coloration est, dès lors, surveillée sous microscope. On assiste au bout d'un temps de l'ordre de la minute à un brunissement des noyaux interphasiques et des chromosomes. La coloration est interrompue par rinçage à l'eau distillée dès que le contraste est suffisant. Cette seconde technique, plus rapide et donnant souvent des marquages contrastés, présente l'inconvénient de ne pas donner une coloration homogène sur la lame; ceci est probablement dû au fait que le mélange entre le nitrate d'argent ammoniacal et la solution de formol est imparfait.

☐ Résultats (fig. 13). — Ils sont à peu près identiques à ceux donnés par la technique des bandes N. Les grains d'argent sont situés sur les bras courts des acrocentriques (chez l'homme) porteurs du DNA ribosomique. Les nucléoles des noyaux interphasiques portent aussi de nombreux grains.

Obtention de plusieurs marquages sur les mêmes préparations

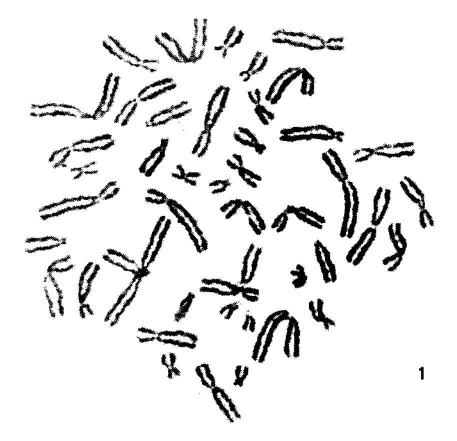
Nous avons vu que l'ensemble des marquages chromosomiques pouvait se résoudre à trois grands systèmes de bandes:

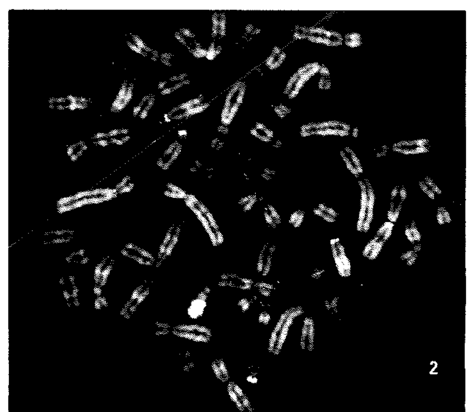
deux systèmes réciproques: les bandes Q (ou G) et les bandes R, qui concernent l'euchromatine, et les bandes C, qui représentent l'hétérochromatine constitutive.

Il peut être utile (par exemple, pour préciser les points de cassure d'un remaniement, localiser les centromères d'un dicentrique...) de pouvoir mettre en évidence toutes ces structures sur la même mitose. Ceci est possible (fig. 14) à condition de respecter un ordre dans le déroulement des techniques successives, et de n'utiliser que des lames préparées au moins 10-15 jours plus tôt.

L'on peut commencer par effectuer une coloration classique au Giemsa. Les mitoses intéressantes sont photographiées et leurs coordonnées relevées. Ensuite, dans un premier temps, l'huile à immersion est retirée par passage dans plusieurs bains de toluène. Puis, la lame est décolorée par passage dans des bains d'éthanol à 70°, puis 50°.

La lame est prête pour la réalisation d'une coloration par la moutarde de quinacrine. Les mêmes mitoses sont à nouveau photographiées (bandes Q).





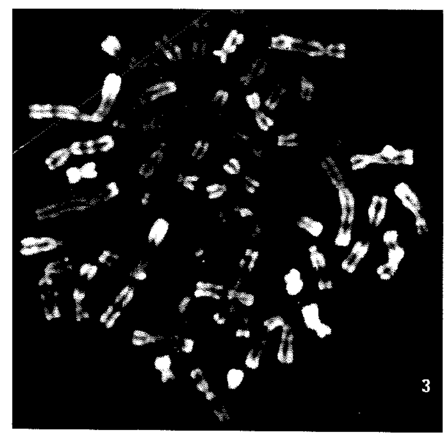


Fig. 14. – *Colorations successives de la même mitose par trois techniques différentes.*

En 1 : coloration au Giemsa ; en 2 : bandes Q ; en 3 : bandes R, coloration à l'acridine orange.

La lamelle est alors soigneusement retirée. Si de l'huile à immersion demeure sous la lame (fluorescence par transmission), elle est essuyée le mieux possible avec un chiffon de cellulose.

La préparation est alors directement plongée dans le bain de Earle, pH 6,5 à 87 °C (sans décoloration) pour la réalisation des bandes R. Les temps de dénaturation sont un peu inférieurs à ce qu'ils auraient été sans coloration à la quinacrine et irradiation UV préalables. Une coloration habituelle au Giemsa ou par l'acridine orange est ensuite effectuée. Cette dernière a l'avantage de permettre la comparaison des deux marquages, Q et R, par deux méthodes de fluorescence.

Enfin, une technique de coloration de l'hétérochromatine, habituellement les bandes C, peut être réalisée après dégraissage de la lame mais sans décoloration préalable. Le traitement par Ba $(OH)_2$ doit être réduit de moitié.

La technique de coloration des organisateurs nucléolaires est plus difficile à réussir après bandes Q et bandes R ; par contre, elle est relativement aisée à obtenir après coloration à la quinacrine seule.

Il est encore possible d'obtenir successivement des bandes G (technique ASG) puis des bandes R. Les résultats nous paraissent toutefois moins reproductibles que par l'utilisation successive des bandes Q et des bandes R.

Méthodes de marquage faisant intervenir un traitement des cellules vivantes

Incorporation de thymidine tritiée

L'incorporation de thymidine tritiée, suivie de la méthode autoradiographique fut pendant longtemps la seule technique de marquage chromosomique.

De réalisation assez simple, dans son principe, elle consiste à mettre de la thymidine tritiée dans le milieu de culture, pendant des temps variables en fonction des buts recherchés. Toutefois, c'est en fin de culture, durant les dernières heures, qu'elle a été le plus utilisée (German, 1964).

La figure 15 montre un marquage autoradiographique obtenu après une incorporation durant les 7 dernières heures. Les segments ayant repliqué leur ADN tardivement sont ainsi mis en évidence. Dans cette cellule femelle, l'X tardif est particulièrement reconnaissable.

□ Technique. — La thymidine tritiée, d'activité spécifique de 5 curies par millimole (thymidine méthyle 3H-TMM 79 B CEA) est placée dans le milieu de culture, de façon à obtenir une activité de 1 μC par ml. Le reste de la culture, le mode d'obtention des préparations, et la coloration des lames s'effectuent tout à fait normalement (cf. p. 10). La seule contrainte importante concerne la manipulation et le rejet du milieu de culture contenant le tritium, qui doit s'effectuer en prenant les précautions d'usage pour le rejet de produits radioactifs.

Les mitoses sont repérées et éventuellement photographiées. La méthode autoradiographique est ensuite comparable à celle décrite pour l'hybridation *in situ* (cf. p. 29. Seule diffère la durée de l'exposition, qui peut durer de 1 à 4 semaines).

Méthodes de traitement par le BrdU

Progressivement développées depuis une dizaine d'années (Zakharov et Egolina, 1968, Palmer, 1970, Zakharov et Egolina, 1972), les méthodes faisant intervenir une incorporation de BrdU (5-bromodéoxyuridine) ont pris une place de tout premier rang dans l'analyse chromosomique.



Fig. 15. — *Autoradiographie d'une cellule féminine après incorporation de thymidine tritiée en phase S tardive (pendant les 7 dernières heures de culture).* La flèche indique l'X de replication tardive.

Principe général

a) *Le BrdU, analogue de la thymidine.* — L'incorporation de BrdU dans l'ADN s'effectue toujours au cours de la réplication. Pour l'instant, seule l'incorporation au cours de la synthèse programmée, ou phase S, a donné des résultats. Le BrdU, dont la formule est la suivante,

O
Br
HN
O N
désoxyribose

est incorporé à la place de la thymidine, dans des proportions qui dépendent de la dose utilisée. Il n'est incorporé qu'en substitution de la thymidine exogène, non synthétisée par la cellule, de sorte que le taux de substitution semble être toujours inférieur à 20 p. 100. Le rendement peut toutefois être augmenté, si la voie de synthèse endogène de thymidine est bloquée ou ralentie. C'est ce qui peut être réalisé par l'adjonction de FudR (5-fluorodéoxyuridine) (Bell et Wolff, 1966). L'incorporation de BrdU est assez rapide, et des traitements brefs, de l'ordre d'une heure entrainent déjà un effet décelable.

La modification chromosomique induite est généralement assez faible. C'est pourquoi la méthode n'est devenue applicable que du jour où cet effet a été potentialisé, d'abord par des colorants: acridine orange (Dutrillaux et coll. 1973), Hoechst 33258 (Latt, 1973), puis par des traitements suivis d'une coloration au Giemsa (Perry et Wolff, 1974; Korenberg et Freedlender, 1974).

b) *Conditions du traitement par le BrdU.* — Il peut intervenir pendant des temps variant entre une fraction de phase S et plusieurs phases S, donc plusieurs cycles cellulaires consécutifs.

La dose de BrdU utilisée, pour les cellules en culture, est généralement 10 μg par ml de milieu final. Des doses plus fortes, d'abord utilisées, induisent un marquage plus fort, mais s'avèrent toxiques et ralentissent pour le moins le cycle cellulaire. Les doses plus faibles, jusqu'à 1 μg par ml peuvent être utilisées, mais induisent un marquage parfois insuffisant.

Nous verrons plus loin comment faire varier les temps de traitement en fonction de l'application recherchée.

Le BrdU est dissout dans une solution physiologique avant d'être ajouté aux cultures, et peut se conserver ainsi environ une semaine à + 4 °C. Cette solution est filtrée sur filtre «Millipore» 0,22 μ, en cas de traitement prolongé des cultures.

La fin de la culture, et l'obtention des préparations chromosomiques est identique à celles décrites précédemment (cf. p. 10).

c) *Coloration et différenciation des chromosomes*

Giemsa: voir p. 24.

Acridine orange: voir p. 25. La différenciation de la coloration sous U.V. est une étape très importante. Pour accélérer cette différenciation, on peut irradier la mitose à analyser en retirant tous les filtres se trouvant sur le faisceau. Prendre soin de retirer les yeux des oculaires.

Hoechst 33258: colorer pendant 12 à 15 minutes dans une solution à 0,5 μg par ml d'eau distillée ou de PBS. Le colorant dilué se conserve peu. Cette coloration, faible et instable sous lumière ultraviolette, n'est plus utilisée telle quelle que pour des applications particulières, mais reste très importante comme première étape pour la coloration au Giemsa, après illumination



Fig. 16. — *Métaphase féminine ayant incorporé le BrdU pendant la période toute terminale de la phase S* (4 dernières heures de culture). *Coloration à l'acridine orange.*

Les régions hétérochromatiques et les bandes G les plus tardives sont sombres. La flèche indique l'X de replication tardive.

U.V., décrite ci-après (technique F P G = Fluorochrome Plus Giemsa) : après coloration par le Hoechst 33258, les lames sont exposées durant une nuit à la lumière ultraviolette émise par un tube germicide U.V., placé à 10 cm environ. Elles sont ensuite traitées par le SSC X 2 (chlorure de sodium 0,3 M, citrate trisodique 0,03 M) durant 2 h à 60 °C. Enfin, elles sont colorées par le Giemsa. Cette méthode, décrite par Perry et Wolff (1974) a subi de nombreuses modifications de détail.

Quels que soient les colorants ou les traitements, les chromosomes ou les segments de chromosomes seront, d'une façon générale, d'autant moins colorés qu'ils auront plus incorporé de BrdU. Pour des raisons de préférence personnelle, nous décrirons toutes les applications et les résultats obtenus après coloration par l'acridine orange.

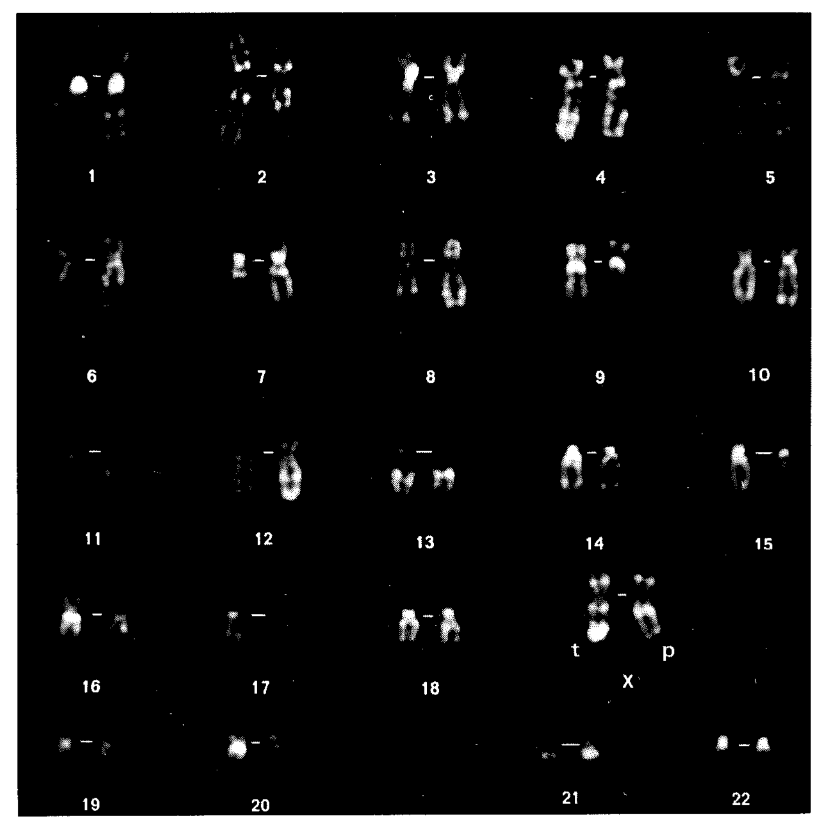


Fig. 17. – *Cellule féminine ayant incorporé le BrdU pendant la totalité de la phase S sauf sa période toute terminale.* (4 dernières heures de culture). *Coloration à l'acridine orange.*

Les régions hétérochromatiques et les plus tardives des bandes G sont seules brillantes. L'X de replication tardive (Xt) présente plus de bandes brillantes que l'X précoce (Xp).

Applications

a) *Mise en évidence des segments de réplication très tardive : segments hétérochromatiques*

☐ «Pulse» terminal (fig. 16). — Le BrdU est ajouté au milieu pendant les 4 dernières heures de culture. Une fraction importante des cellules (environ la moitié) montre une élongation caractéristique de certains segments qui émettent une fluorescence rouge sombre, tandis que le reste des chromatides émet une fluorescence vert brillant.



Fig. 18. – *Cellule féminine ayant incorporé le BrdU pendant les 7 dernières heures de culture. Coloration à l'acridine orange.*

Les bandes G, ainsi que l'X tardif (X_t), sont sombres, les bandes R autosomiques et celles de l'X précoce (X_p), brillantes.

☐ « Pulse » précoce (fig. 17). — Le BrdU est placé dans le milieu durant la nuit, soit environ 14 à 15 h. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu sans BrdU, où les cellules sont laissées pendant 4 h.

Le changement de milieu s'effectue après centrifugation pour les cultures de cellules sanguines, et par transvasement et pipetage pour les cultures de fibroblastes. Un ou deux rinçages sont nécessaires avant de mettre le milieu final.

Les manipulations doivent être effectuées aussi vite que possible, avec des milieux à 37 °C, tout refroidissement excessif tendant à ralentir le cycle cellulaire.

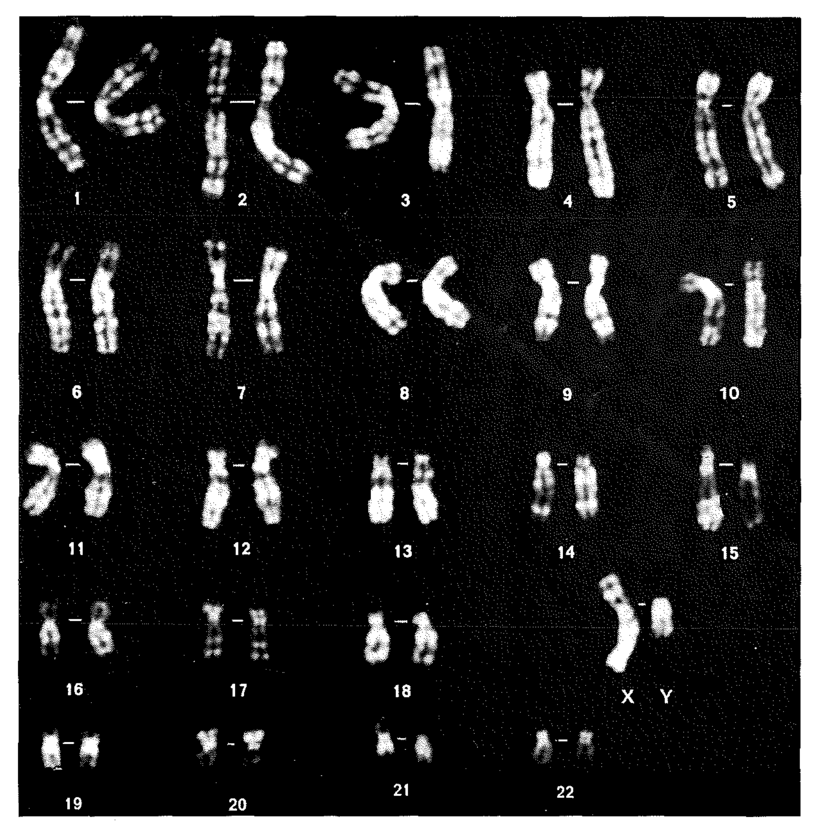


Fig. 19. — *Cellule ayant incorporé le BrdU seulement pendant la première moitié de la phase S, la deuxième moitié* (7 dernières heures de culture) *s'étant déroulée en milieu normal. Coloration à l'acridine orange.* Les bandes G et les régions hétérochromatiques sont brillantes, les bandes R sont sombres.

Les mitoses ont des aspects hétérogènes, en raison des vitesses différentes des cycles cellulaires. Une large proportion, toutefois, se caractérise par la faible fluorescence jaunâtre de l'ensemble des chromosomes, à l'exception des segments qui n'avaient pas encore effectué la réplication de leur ADN au moment du rinçage. Ceux-ci émettent une fluorescence vert brillant. Une forte irradiation U.V. est souvent nécessaire pour obtenir une bonne différenciation. Il arrive fréquemment qu'aucun marquage ne soit décelable au début de l'observation sous lumière U.V.

b) *Différenciation des segments euchromatiques de réplication tardive et précoce*

☐ «Pulse» terminal (fig. 18). — Traiter durant les 6-7 dernières heures

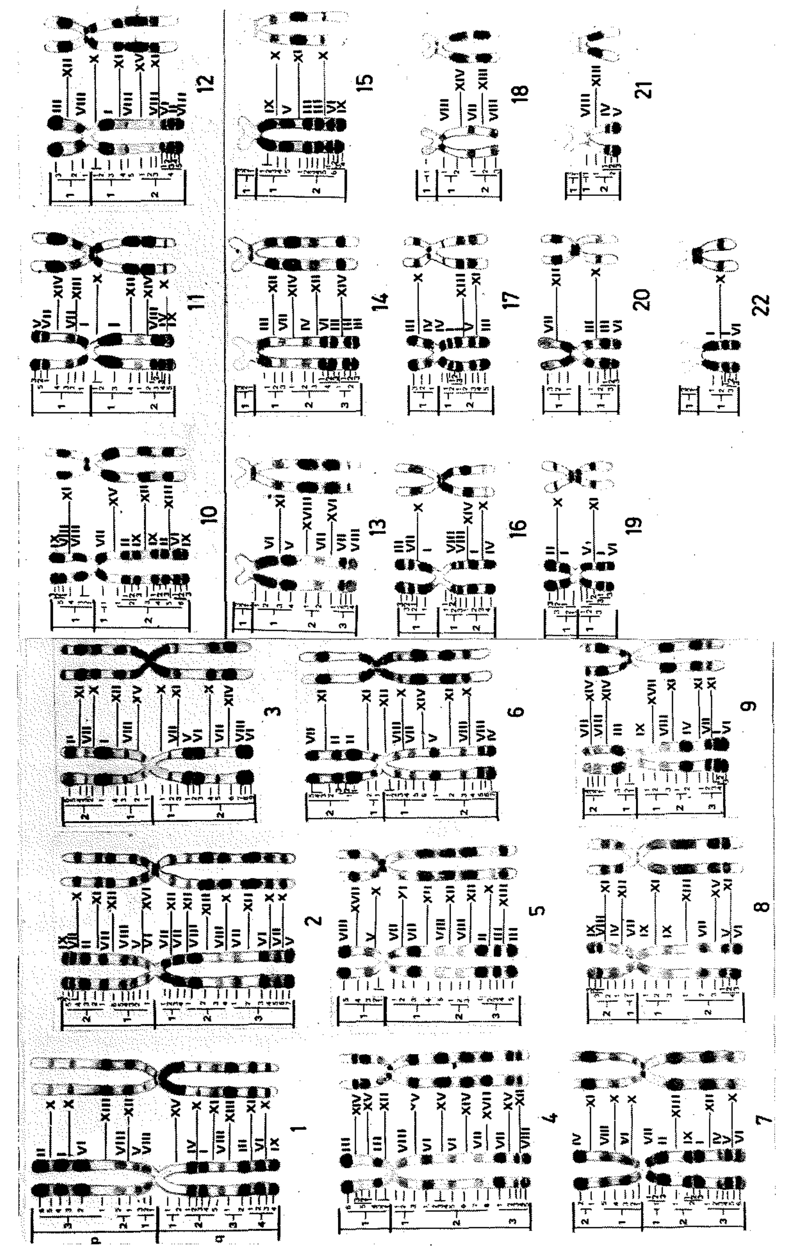


Fig. 20. — *Carte de la chronologie de la réplication des bandes autosomiques.*

18 groupes de réplication ont été définis (chiffres romains), le groupe I étant le plus précoce, le groupe XVIII, le plus tardif. Les bandes R (à g.) de réplication précoce, font partie des groupes I à IX, les bandes G (à d.), de réplication tardive, font partie des groupes IX à XVIII.

de culture. Tous les segments correspondant aux bandes G et à l'hétérochromatine s'étant repliqués en présence de BrdU émettent une fluorescence rouge sombre. Les bandes R restent vert brillant. C'est donc un marquage R qui apparaît.

Dans les cellules femelles, la distinction entre les deux chromosomes X est très aisée, l'un étant de réplication tardive, émet presque entièrement une fluorescence faible et rougeâtre. L'autre, de réplication précoce, se comporte comme un autosome.

☐ «Pulse» précoce (fig. 19). — Traiter par le BrdU durant une dizaine d'heures, rinçer, et remettre du milieu normal durant les 7 dernières heures.

Le marquage obtenu est l'inverse du précédent, les segments de replication tardive étant vert brillant.

☐ Analyse du temps de réplication des bandes. — Parmi les bandes R, qui effectuent donc la réplication de leur ADN en phase S précoce, et parmi les bandes G qui effectuent la réplication en phase S tardive, il existe des différences de chronologie.

Il suffit donc de faire des traitements de durées intermédiaires entre 3 et 7 heures pour différencier les bandes G entre elles, et intermédiaires entre 7 et 12 heures avant la fin de la culture pour différencier les bandes R entre elles.

Ceci permet d'établir une carte de la séquence de réplication, qui apporte un élément supplémentaire pour l'identification des structures chromosomiques (fig. 20) (Dutrillaux et coll., 1976).

c) *Traitements par le BrdU durant 2 cycles consécutifs.* — L'incorporation de BrdU durant deux cycles consécutifs aboutit à une répartition inéquitable du BrdU sur les chromatides sœurs. En raison de la réplication semi-conservative de l'ADN, chaque chromatide sera en effet constituée, après un cycle entier d'incorporation de BrdU, d'une molécule d'ADN dont 1 brin sera substitué et l'autre non. Après un nouveau cycle d'incorporation, seul un brin sur 4 sera non substitué. A l'échelle chromosomique, cela signifiera qu'une chromatide aura un ADN bi-substitué et que l'autre n'aura du BrdU que sur un seul brin.

Un traitement d'une trentaine d'heures par le BrdU, à une dose comprise entre 1 et 10 μg par ml, permet d'obtenir cette différenciation qui devient apparente dans les mêmes conditions que pour les traitements plus brefs (Latt, 1973; Dutrillaux et coll., 1974).

☐ Applications. — La distinction entre les 2 chromatides sœurs (fig. 21) met en évidence les échanges survenus entre elles (échanges de chromatides sœurs = «sister chromatid exchanges» = SCE). On ne sait pas encore avec certitude quel est le taux spontané de SCE par division cellulaire. En effet, le BrdU, qui sert de révélateur, en induisant, le nombre moyen d'échanges est proportionnel à la dose utilisée. D'autre part, l'importance de

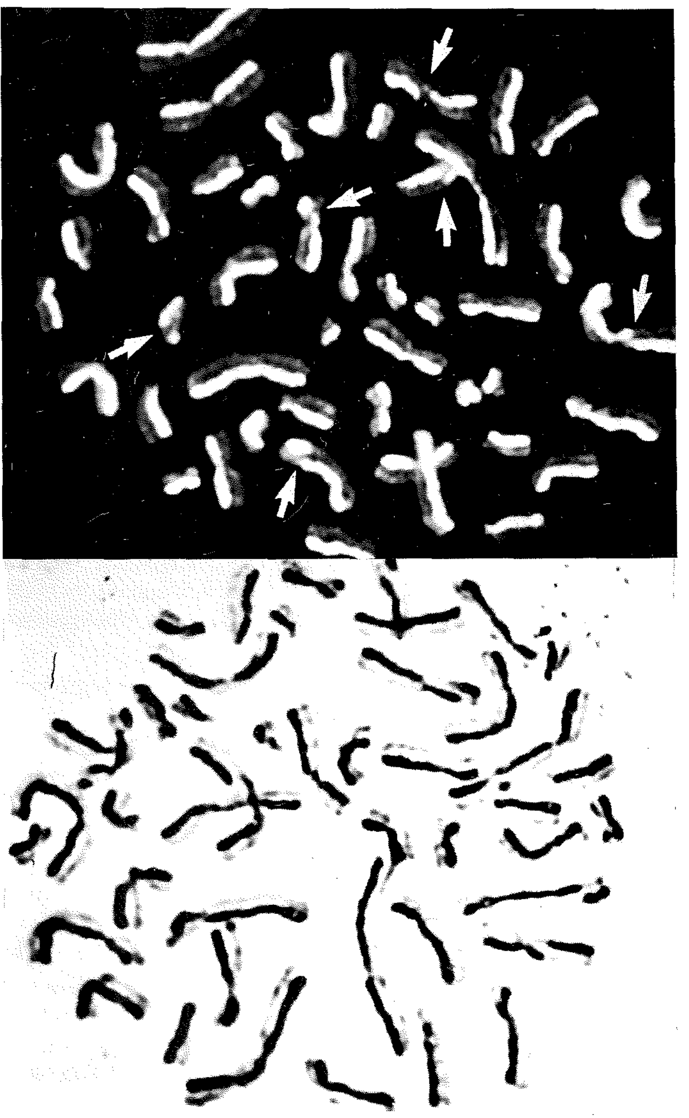


Fig. 21. — *Cellule ayant incorporé le BrdU durant les deux derniers cycles de synthèse de l'ADN.*

(36 dernières heures de culture). En haut, coloration à l'acridine orange. Les chromatides brillantes ont incorporé le BdrU sur un seul des brins de leur chaîne d'ADN, les sombres, sur les deux brins. Les flèches indiquent des échanges entre chromatides sœurs. En bas, technique FPG.

l'incorporation dépend certainement aussi de la composition du milieu de culture utilisé. Il est donc difficile de donner une valeur absolue à ce taux de SCE. Pour une dose de BrdU de 10 µg par ml, dans du milieu TC 199 + 20 p. 100 de sérum, on dénombre, en moyenne, autour de 8 SCE par cellule, ce qui signifie qu'il s'est produit une moyenne de 4 SCE par cycle. Des taux plus faibles peuvent être mis en évidence, en baissant la dose de BrdU. Il semble qu'on ne puisse guère descendre en dessous de 2-3 SCE par cellule. La survenue des SCE semble liée au processus de réparation de l'ADN. Leur analyse est devenue l'une des méthodes les plus utilisées pour tester l'effet des mutagènes. (Perry et Evans, 1975; Latt et coll., 1975).

□ Technique. — *In vitro,* il suffit de mettre 10 µg de BrdU par ml de milieu, pendant une trentaine d'heures. Les colorations sont les mêmes que pour les traitements plus brefs. Chez l'animal, des traitements *in vivo* peuvent être effectués. Il existe ainsi des implants que l'on peut placer dans le tissu sous-cutané.

On peut encore réaliser une perfusion, et injecter le BrdU en solution à la dose désirée, calculée en fonction du poids de l'animal. Pour des animaux petits, ou vivant en milieu liquide, on peut faire ingérer le BrdU.

Mis à part la perfusion, qui peut être dosée précisément, il faut savoir que les traitements sur le vivant aboutissent à des fluctuations de la dose de BrdU, et de grandes précautions doivent être prises pour l'interprétation du taux de SCE.

Signalons enfin que si le traitement ne recouvre pas intégralement les deux phases S, l'incorporation ne se fera pas sur certains segments de chromatides. Ainsi, si l'incorporation commence seulement au milieu de la première phase S, les bandes R, déjà répliquées n'incorporeront le BrdU qu'au second cycle. Il en résultera un marquage de type R, surtout visible sur la chromatide la plus colorée.

Ceci permet de reconnaître les chromosomes, tout en effectuant l'analyse des SCE. Toutefois, le taux des SCE peut diminuer d'autant que l'incorporation de BrdU aura été moindre.

Seules les cultures de cellules sanguines échappent à cette difficulté si le traitement par le BrdU est commencé dès le début de la culture. Les cultures de 60-72 h donnent une bonne proportion de cellules ayant effectué 2 cycles entiers sous BrdU. La présence de BrdU ne semble pas gêner beaucoup la transformation des lymphocytes en culture.

d) *Traitement par le BrdU durant plus de 2 cycles.* — Le traitement par le BrdU peut être maintenu durant plusieurs cycles, de sorte que le nombre de brins d'ADN ne l'ayant pas incorporé devienne très faible.

Après 3 cycles d'incorporation, il y aura statistiquement 3/4 des chromatides bi-substitulées (fig. 22). Après 4 cycles, il y en aura les 7/8e.



Fig. 22. — *Cellule ayant incorporé le BrdU durant les trois derniers cycles de synthèse de l'ADN. Coloration à l'acridine orange.*

Le quart seulement de la longueur des chromatides est brillant. Il existe des échanges non réciproques et des chromosomes entièrement sombres.

Remarquer qu'un léger marquage R persiste sur des chromosomes entièrement sombres (flèches sur les deux chromosomes 7).

Mis à part l'intérêt théorique confirmant le mode semi-conservatif de la replication de l'ADN et montrant la survie possible des cellules, ces incorporations prolongées de BrdU n'ont pas reçu d'application pratique.

e) *Marquage des chromosomes asymétriques.* — Pour analyser la position des échanges de chromatides, il peut être utile d'induire un marquage des chromatides. Plusieurs possibilités existent: coloration par la moutarde de quinacrine, (Latt et coll., 1975) traitement thermique pour obtenir des

bandes R (Dutrillaux et coll., 1974), ou traitement par le SSC X2, pendant une vingtaine d'heures à 58 °C, suivi d'une coloration au Giemsa pour obtenir des bandes G (Fonatsch, 1979).

En plus de ces méthodes, il est possible de jouer sur le temps de traitement par le BrdU, de façon à obtenir un marquage lié à une incorporation incomplète, soit lors de l'avant dernière phase S, comme nous l'avons vu plus haut, soit lors de la dernière phase S. Dans cette dernière éventualité, il suffit de changer le milieu de culture 7 h avant la fin, et de le remplacer par un milieu normal, sans BrdU. Les chromosomes sont alors marqués en bandes de type G avec une forte coloration de l'hétérochromatine, une différenciation des X de replication précoce et tardive, et les échanges de chromatides peuvent être localisés (Dutrillaux, 1975 b).

f) *Différenciation des segments chromosomiques en fonction de leur richesse en bases A-T ou G-C.* — En tant qu'analogue de la thymidine, le BrdU peut être incorporé proportionnellement à la richesse en ce nucléotide, dans un chromosome donné.

☐ Asymétrie du chromosome Y humain, et de quelques autres segments hétérochromatiques. — Chez l'homme, l'incorporation de BrdU durant la seule dernière phase S induit un aspect asymétrique de l'Y, des bras courts des acrocentriques et des constrictions secondaires des chromosomes 1 et 16.

Ceci, d'abord reconnu pour l'Y, a été interprété comme résultant d'une distribution inéquitable de la thymine et de l'adénine sur l'un et l'autre brins de la molécule d'ADN (Latt et coll., 1974).

Chez la souris, le même aspect d'asymétrie était reconnu, à peu près en même temps, au niveau de toutes les régions juxta-centrométriques (Lin et coll., 1974).

Ces asymétries sont assez faciles à détecter en utilisant différents colorants: Hoechst 33258, Giemsa (Angel et Jacobs, 1975), ou acridine orange.

☐ Mise en évidence de l'hétérochromatine riche en G-C. — Le traitement par le BrdU durant toute une phase S montre clairement, chez certaines espèces, une incorporation relativement faible sur certains segments. Chez *Cebus capucinus,* par exemple, de longs segments d'hétérochromatine R-positive sont relativement moins modifiés que l'euchromatine (fig. 23).

Ces segments sont porteurs d'un ADN satellite riche en G-C. (Couturier et Coll. 1981). Cette détection de segments hétérochromatiques riches en G-C a été étendue à d'autres espèces.

Technique: on ajoute le BrdU à 10 μg par ml durant les dernières 15-18 h de culture. Coloration par l'acridine orange. Une bonne différenciation par irradiation ultra-violette est nécessaire.

☐ Différenciation des segments euchromatiques. — Dans les conditions habituelles, la coloration longitudinale des chromatides est à peu près

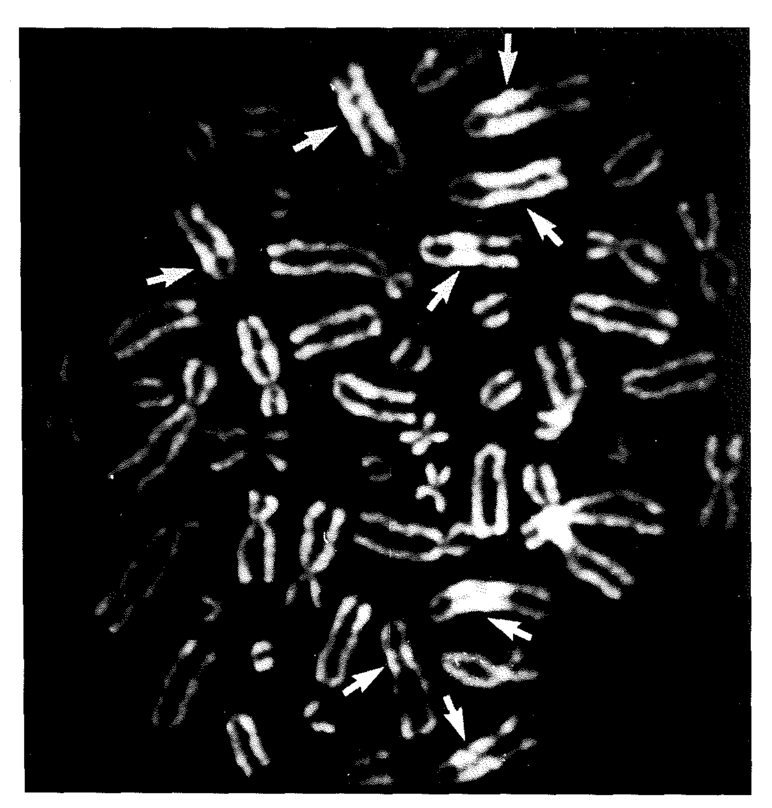


Fig. 23. — *Métaphase de* Cebus capucinus *ayant incorporé le BrdU pendant la totalité de la dernière phase de synthèse de l'ADN* (20 dernières heures de culture). *Coloration à l'acridine orange*

Les chromosomes sont sombres sur toute leur longueur excepté certains segments qui demeurent relativement fluorescents. Il s'agit de régions hétérochromatiques particulièrement riches en séquences G-C, incorporant par conséquent moins le BrdU.

homogène, après l'incorporation de BrdU durant une ou plusieurs phases S entières. Ceci peut s'interpréter par une répartition homogène des bases A-T. et G-C., ou par des différences de répartition insuffisantes pour être détectées.

L'utilisation d'une dose plus faible de BrdU, de l'ordre de 5 μg par ml, durant 1, 2 ou 3 phases S, suivie d'une coloration par l'acridine orange permet d'obtenir un léger marquage de type R (fig. 22).

Dans ces conditions limites, il semble donc bien y avoir une incorporation plus grande au niveau des bandes Q; cela peut s'interpréter comme une

richesse plus grande en G-C au niveau des bandes R, mais on ne peut exclure que le marquage résulte de la persistance d'un stock de thymidine intracellulaire, incorporé au niveau des bandes R au tout début de la réplication et rapidement épuisé ensuite.

Traitement par l'actinomycine D

L'actinomycine D est un antibiotique qui se lie spécifiquement aux bases G-C entre lesquelles elle s'intercale (Sobell et Jain, 1972). A forte dose, elle bloque les cultures cellulaires. A faible dose, elle modifie simplement la structure des chromatides, en retardant ou empêchant la condensation des bandes R (Shafer, 1973, Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1976 b).

☐ Technique. — L'actinomycine D est mise à la concentration de 0,05 à 1 μg par ml pendant les 2 à 6 dernières heures de culture. Le reste de la technique est identique à la méthode de base.

Après coloration au Giemsa, les chromosomes, peu condensés au niveau des bandes R, ont un marquage G, souvent imparfait en raison de l'atteinte incomplète des bandes R.

Le traitement par l'actinomycine D ne constitue donc pas une bonne méthode de marquage, mais est intéressant pour l'étude de la richesse en bases G-C, et pour l'étude de la condensation chromatidienne.

Traitements par la 5-azacytidine

La 5-azacytidine (5-ACR) est un analogue de la cytidine. D'abord expérimentée chez les plantes (Fucik et coll., 1970), elle s'avère efficace pour modifier la structure chromosomique des mammifères (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1976 a).

☐ Technique

— Méthode d'obtention de bandes R : la 5-ACR est utilisée à la concentration finale de 5. 10^{-5} à 10^{-4} M, pendant les 5-7 dernières heures de culture. Le défaut de condensation des bandes G qui en résulte induit un marquage R assez typique.

Une association entre chromosomes acrocentriques, et entre télomères de non acrocentriques est souvent constatée. Malheureusement, comme pour l'actinomycine-D, la 5-ACR ne change pas la coloration des chromosomes, ni par le Giemsa, ni par les divers fluorochromes expérimentés. De la sorte, elle demeure une technique de marquage d'un intérêt pratique limité. Dans les conditions précitées, la 5-ACR agit par substitution à la cytidine, mais ne caractérise que les segments de replication tardive qui l'ont incorporée (bandes G et hétérochromatine), indépendamment de leur richesse en bases A-T ou G-C.

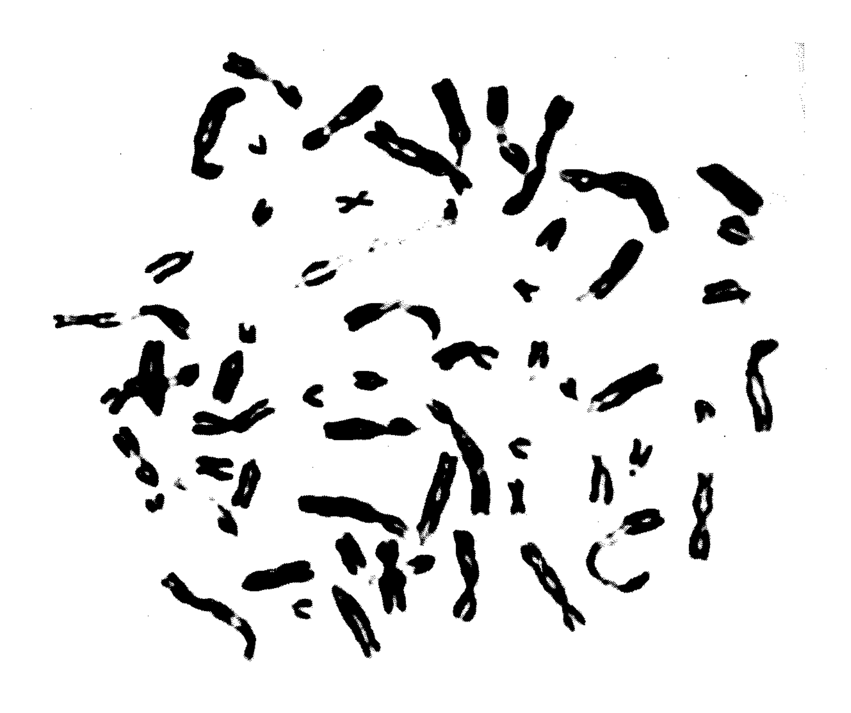


Fig. 24. – *Métaphase de* Cebus capucinus *ayant subi un traitement par la 5-Azacytidine à très faible dose pendant les 7 dernières heures de culture, ce qui empêche la condensation de l'hétérochromatine riche en G-C. Coloration au Giemsa.*

— Caractérisation de l'hétérochromatine riche en guanine-cytosine (G-C) (fig. 24): Utilisée à dose moindre (10^{-5} à 10^{-6} M), la 5-ACR ne modifie pas la condensation chromosomique des cellules humaines, ni celle de beaucoup d'autres espèces de mammifères. Par contre, chez les espèces possédant de l'hétérochromatine riche en G-C comme *Cebus capucinus,* une forte élongation des régions correspondantes est constatée (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1981). Une très bonne spécificité semble exister, rendant la méthode utile pour cette application. Toutefois, la 5-ACR, rapidement métabolisée et dont l'incorporation dépend sans doute de nombreux paramètres, est d'un emploi délicat.



Obtention et marquage des cellules en prophase ou prométaphase.

Avec le marquage chromosomique, dont nous venons de voir les principales méthodes, il est possible de dénombrer des structures, essentiellement bandes R ou G, dont le nombre est assez proportionnel à la longueur des chromatides. Ainsi, en métaphase, sur des chromosomes condensés, il est possible de distinguer environ 300 bandes par lot haploïde.

Si l'on sélectionne les mitoses dont les chromosomes sont les plus longs, on peut dénombrer de 400 à 600 bandes (Prieur et al., 1973, Skovby, 1975). A cet égard, l'utilisation d'un milieu composé de sérum dilué pour réaliser le choc hypotonique est un élément important pour obtenir de longs chromosomes. Cependant, l'obtention de cellules en prophase demeurant aléatoire, on a maintenant recours à des méthodes de synchronisation, qui permettent d'atteindre le but recherché.

De nombreux agents sont susceptibles de bloquer à une phase donnée le cycle cellulaire, de façon réversible. Parmi d'autres, citons le fluorodéoxyuridine (FudR), l'améthoptérine ou méthotrexate, la thymidine, et le 5-bromodéoxyuridine (BrdU). Seuls les trois derniers ont été efficacement utilisés.

Synchronisation par la thymidine

La thymidine bloque le cycle cellulaire pendant la phase S par inhibition de synthèse de la 2'-déoxycytidine (Xeros, 1962) lorsqu'elle est mise en excès dans le milieu de culture. D'après les essais réalisés avec un double traitement de thymidine et de BrdU, le blocage principal survient au milieu de la phase S, soit, après réplication de l'ADN des bandes R et avant celle des bandes G (Dutrillaux, 1975 b, Viegas-Péquignot et Dutrillaux 1978).

Ceci signifie que pour obtenir un maximum de cellules en prophase ou prométaphase, il faut les récolter 5 à 7 h. après la levée du blocage.

☐ Technique

— Culture de cellules sanguines (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1978).
— Bien qu'elle puisse être mise d'emblée, on préfère ajouter la thymidine après 48 à 72 h. de culture, à la concentration finale de 0,3 mg par ml de milieu. Les cultures sont laissées ainsi, à 37 °C, pendant 15 h environ (durant la nuit). Puis, le milieu contenant la thymidine est retiré, après centrifugation et pipetage, et remplacé par un milieu de rinçage, constitué d'une solution physiologique saline (PBS par exemple). Les cellules sont remises en suspension par pipetage, à nouveau centrifugées, et le milieu de rinçage est éliminé. Après un deuxième rinçage, semblable au premier, du milieu complet (TC 199 + sérum) est remis, pendant les 5-7 dernières heures de culture.

Pour éviter les rinçages, on peut simplement ajouter de la 2'-déoxycytidine, à la dose de 0,5 mg par ml et laisser la culture évoluer ainsi 5 à 7 h de plus (Viegas-Péquignot, 1981).

Le reste de la technique est identique à ce qui a été décrit plus haut. On a cependant intérêt à multiplier les fixations (4 à 6) pour obtenir un meilleur étalement.

— Culture de fibroblastes. — D'une façon générale, il est plus délicat d'obtenir une bonne synchronisation des cultures de fibroblastes.

La thymidine est ajoutée 8 h après la division, à la concentration finale de 1 mg par ml.

Le reste de la technique est identique à celle des lymphocytes. Selon la qualité des cultures, le cycle cellulaire peut varier sensiblement, et il peut être nécessaire de faire plusieurs essais pour ajuster les temps.

Synchronisation par l'améthoptérine

Dans les cultures de cellules sanguines, l'améthoptérine est ajoutée, après 72 h, à la concentration finale de 10^{-7} M (Yunis, 1976). Après une nuit (environ 15 h), le milieu est remplacé, après rinçages comme pour la thymidine, par un milieu normal, pendant 5-7 h.

Marquage des cellules en prophase ou en prométaphase

Les prométaphases et prophases obtenues par les méthodes de synchronisation sont ensuite traitées pour obtenir un marquage comme s'il s'agissait de mitoses ordinaires. Pour obtenir des bandes R, il faut faire un traitement thermique un peu plus court que pour les métaphases.

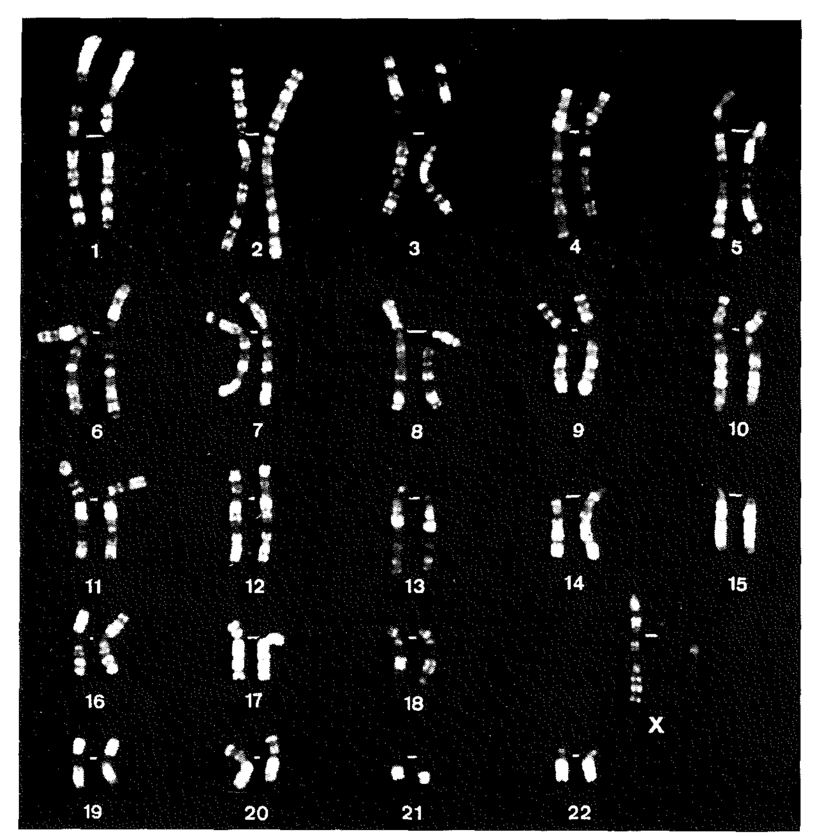


Fig. 25. – *Prométaphase en bandes R obtenue après synchronisation par la thymidine et incorporation de BrdU durant les 7 dernières heures. Coloration par l'acridine orange.*

L'X de replication tardive est à droite.

☐ Variantes pour l'obtention des bandes G

Yunis et coll. (1978) obtiennent des bandes G sans prétraitement, par simple coloration des préparations par le colorant de Wright. Celui-ci est préparé ainsi : 1 volume de la solution mère (à 0,25 p. 100 dans du méthanol) est dilué dans 3 volumes de tampon phosphates 0,06 M, pH 6,8. Les lames sont colorées pendant 3 mn à 3 mn 30.

Francke et Oliver (1978) recommandent un prétraitement des préparations par chauffage et action protéolytique. Les lames sont chauffées 3 jours à 55 °C, ou une nuit à 65 °C, ou encore 10 à 20 min. à 90 °C. Après refroidissement, elles sont traitées 15 à 60 sec. par une solution de trypsine à 0,05 p.

100 dans du chlorure de sodium isotonique. Les lames sont rincées rapidement dans deux bains de chlorure de sodium ou d'éthanol 95°. Elles sont séchées puis colorées 90 sec. à 2 min. au colorant de Wright ou au Giemsa.

Synchronisation par la thymidine et incorporation de BrdU

Par rapport à la méthode de synchronisation par la thymidine décrite plus haut, il suffit d'ajouter du BrdU, à la dose de 10 μg par ml de milieu final, durant les 6-7 dernières heures (Viegas-Péquignot et Dutrillaux, 1978). Ceci permet d'obtenir, après coloration par l'acridine orange (cf. p. 25), ou coloration FPG (cf. p. 49) un très beau marquage en bandes R (fig. 25).

Pour cette technique, il n'est pas possible de remplacer les rinçages par l'addition de 2'-déoxycytidine.

En plus des deux colorations citées ci-dessus, on peut encore effectuer une coloration au Giemsa des cellules observées après coloration par l'acridine orange. Il faut pour cela effectuer un bref traitement thermique, à 87 °C, pendant 15-60 secondes, dans une solution de Earle à pH 6,5, avant la coloration au Giemsa (Dutrillaux et coll., 1980). Ce traitement rend les préparations définitives, et améliore le marquage de certaines mitoses.

Synchronisation par le BrdU

Le 5-bromodéoxyuridine à forte dose induit le même blocage que la thymidine et le méthotrexate, en milieu de phase S. En utilisant cette propriété et la modification chromatidienne résultant de son incorporation dans les bandes R qui effectuent leur replication avant le blocage, on obtient, après coloration par l'acridine orange ou technique FPG, un très beau marquage G des prophases et prométaphases (Dutrillaux et Viegas-Péquignot, 1981).

☐ Principe. — A une culture de cellules sanguines, on ajoute pendant une nuit (15 h environ) du BrdU à forte concentration. Après rinçage, les cellules sont remises dans un milieu normal.

☐ Résultats. — La figure 26 montre une mitose en prométaphase marquée en bandes G après coloration FPG. Ce type de mitose est nettement prépondérant. Toutefois, il semble exister d'autres points de blocage du cycle cellulaire, de sorte qu'une petite partie des mitoses porte un autre marquage.

Ainsi, un second aspect observé correspond à un marquage R typique, dont la figure 27 donne un aperçu. Ceci correspond vraisemblablement à un blocage en fin de phase S de cellules qui se trouvaient en milieu de phase S au moment où le traitement par le BrdU a été commencé. Le troisième aspect correspond à un marquage de l'hétérochromatine et des bandes G les plus tardives. Il est semblable à celui induit par un traitement par le BrdU

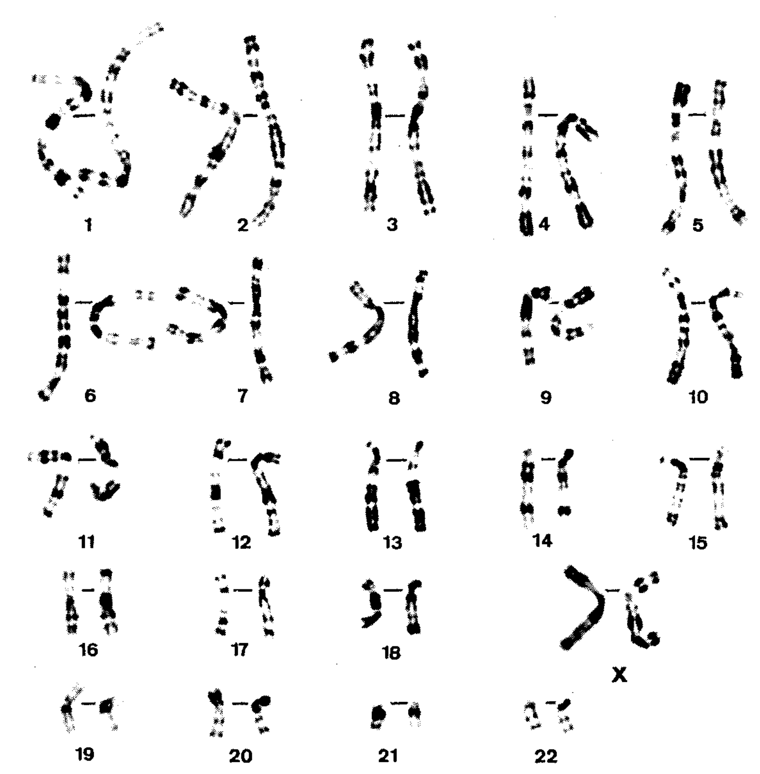


Fig. 26. – *Prométaphase en bandes G obtenue après synchronisation par BrdU, et culture avec thymidine durant les 7 dernières heures. Coloration par le Giemsa* (FPG).

L'X de replication tardive est à gauche.

durant les 3-4 dernières heures (cf. p. 50). Enfin, un faible pourcentage de mitoses montre une asymétrie chromatidienne associée à un marquage G.

Cette méthode de synchronisation par le BrdU donne donc, sur les mêmes préparations, un très beau marquage G, un très beau marquage R, et divers autres aspects. Il nous paraît très probable qu'elle tiendra un rôle prépondérant dans la cytogénétique future.

Pour cette raison, nous allons en donner tous les détails, même si cela entraîne quelques redites.

☐ Technique détaillée. — Après 48 à 72 h de culture de cellules sanguines, le BrdU est ajouté à la concentration finale de 0,2 mg par ml. Laisser pendant une nuit (environ 15 h). Centrifuger, retirer le surnageant, ajouter du milieu de rinçage (PBS, par exemple, à 37 °C), remettre en suspension, et effectuer un second rinçage. Remettre du milieu complet (TC 199 + sérum)

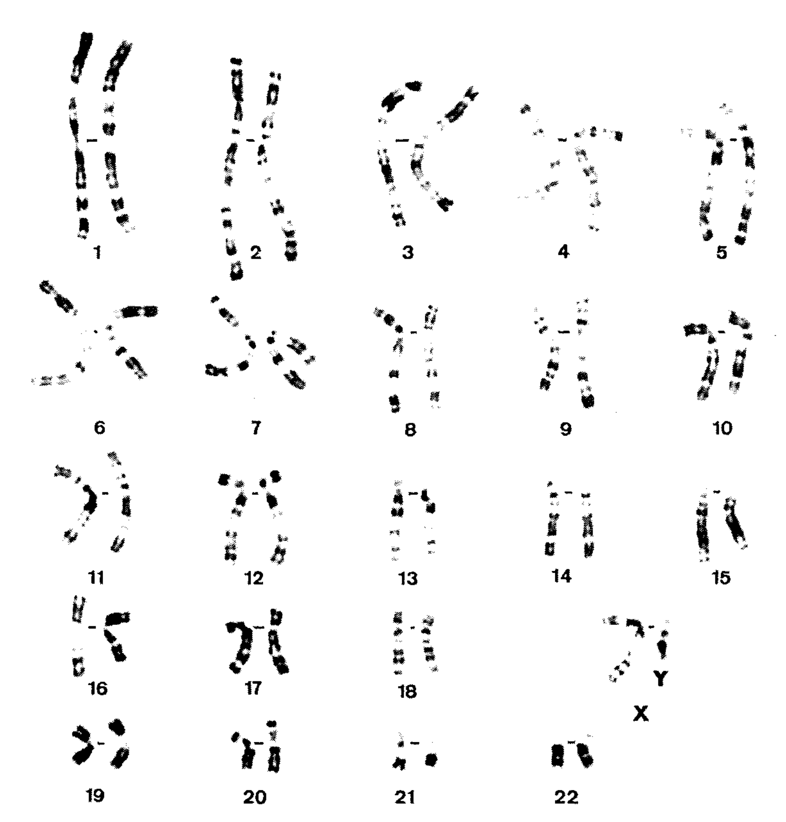


Fig. 27. – *Prométaphase en bandes R obtenue après le même traitement que pour la figure 26.*

Bien que ce traitement permette d'obtenir aussi de nombreuses prophases, ce stade n'a pas été illustré car il nécessiterait de trop grandes figures.

enrichi de thymidine (3 μg par ml) et laisser à 37 °C pendant 5-7 h. Plus de prophases sont obtenues pour 5 h, plus de mitoses à divers stades sont obtenues pour 7 h.

Faire le choc hypotonique (sérum: 1 vol, eau: 5 vol) pendant une vingtaine de minutes. Après une première fixation de 10-15 min. au Carnoy II (chloroformé), effectuer 3 ou 4 fixations de 10 min. successives au Carnoy I (éthanol-acétique).

Étaler sur lames froides et humides.

Colorer par l'acridine orange (cf. p. 25), ou encore par une modification de la technique FPG:

Colorer par le Hoechst 33258 à 1 mg pour 100 ml d'eau distillée pendant 15 min. Rincer, monter avec du SSC X 2.

Placer la lame dans une boîte de Petri contenant du papier filtre recouvert de SSC X 2.

Mettre la boîte de Petri sur le faisceau de lumière émise par une lampe à vapeur de mercure (type HBO 200). On prendra, par exemple, un luminaire habituellement utilisé pour la microscopie en fluorescence. Afin de maintenir la lampe verticale, ce qui est recommandé pour son utilisation, et de placer la boîte de Petri à plat, on interposera un miroir, incliné à 45° sur le trajet lumineux. Le trajet total du faisceau peut être de l'ordre de 30 à 40 cm.

On peut encore utiliser un tube fluorescent, type « lumière noire », moins onéreux que la lampe à vapeur de mercure. Les lames sont alors placées à 10 cm, environ, du tube.

Plusieurs lames peuvent être superposées pour être irradiées simultanément.

La boîte de Petri, posée sur un fond noir mat, atteindra une température de plus de 50 °C après quelques minutes d'irradiation. Elle sera maintenue environ 1 h sous le faisceau lumineux.

Rinçer les lames à l'eau courante, et colorer au Giemsa à 1,5 p. 100 pendant 7 min.

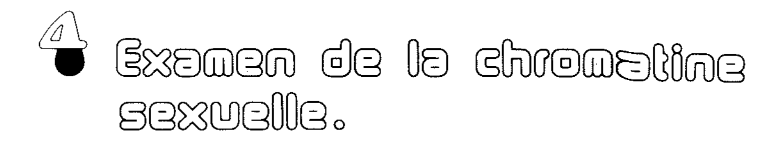
Ce seul traitement permet d'obtenir les différentes figures dont nous avons parlé plus haut.

Il peut arriver que les chromosomes soient trop colorés par le Giemsa. Dans ce cas, il suffit, après les avoir dégraissées au toluène, soit de traiter les lames par le SSC X 2 à 60 °C pendant une ou deux heures (amélioration des bandes G surtout), soit de les traiter par du Earle à pH 6,5 à 87 °C pendant 20 à 60 secondes (amélioration des bandes R surtout).

Plusieurs traitements-colorations successifs peuvent être effectués, en cas de besoin.

On peut encore faire varier soit la durée ou le mode de l'exposition aux U.V., soit la durée de la coloration au Giemsa ou la concentration de celui-ci, soit la durée des traitements thermiques. Ces différentes variantes ne doivent pas faire croire que la technique est difficile ou aléatoire. Elle est finalement de réalisation très simple, très adaptable et permet d'obtenir chaque fois des images chromosomiques d'une qualité supérieure.

○



4 Examen de la chromatine sexuelle.

Corpuscule X (corps de Barr)

Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler d'un examen chromosomique, la recherche du corpuscule de Barr fait souvent partie de l'examen caryotypique. Elle doit son intérêt au fait qu'elle permet d'explorer la garniture gonosomique d'un tissu (l'épithélium de la muqueuse jugale) dont le caryotype n'est habituellement pas étudié.

☐ Techniques. — Elles sont très nombreuses. Celle que nous décrivons est dérivée de celle de Moore et Barr (1955). Le prélèvement est fait par grattage de la face interne de la joue à l'aide d'une spatule métallique ou d'une lame de verre. Les amas cellulaires ainsi ramenés sont rapidement étalés, en une mince couche, sur une lame porte-objet propre. Celle-ci est immédiatement plongée dans du fixateur de Carnoy pendant 30 minutes puis séchée spontanément à l'air. Hydrolyser par passage dans HCl 5 N à la température ambiante pendant 20 minutes. Rincer 3 minutes à l'eau courante puis plonger les lames dans une solution aqueuse à 0,5 % de violet de cresyle pendant 5 minutes. Rincer à l'eau courante et laisser sécher. On peut employer aussi comme colorant le bleu de toluidine à 0,1 %, en solution aqueuse.

☐ Résultat. — La chromatine sexuelle apparaît sous la forme d'un corpuscule bleu foncé, accollé à la membrane nucléaire. On compte, en général, sur un total de 200 noyaux, ceux qui sont porteurs d'un (ou plusieurs) corpuscules. Il existe, au maximum, autant de corpuscules par noyaux que de chromosomes X moins un dans la constitution du sujet. Seule une fraction

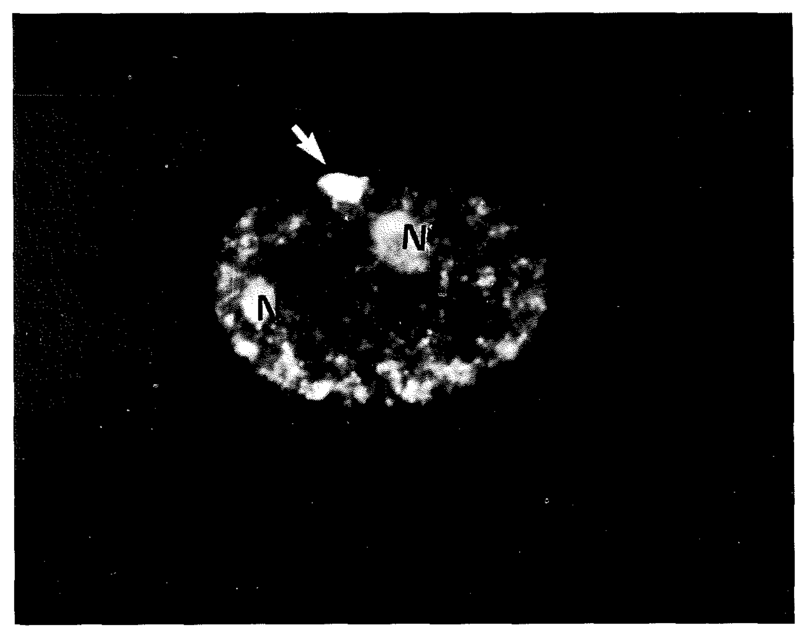


Fig. 28. – *Noyau de fibroblaste en interphase, coloré par l'acridine orange montrant le corpuscule de Barr,* (flèche).

Les nucléoles (N) sont colorés en rouge.

des cellules montre ce corpuscule: entre 5 et 30 p. 100, pour l'épithélium jugal, entre 70 et 90 p. 100 des fibroblastes en culture, chez une femme normale. On peut apprécier aussi des anomalies de taille du corpuscule.

Bien qu'il s'agisse d'un examen de réalisation fort simple, la lecture des préparations est délicate et donne souvent lieu à des interprétations erronées. Pour les cellules en culture (fibroblastes), une coloration par l'acridine orange (cf. p. 25) donne une meilleure différenciation entre le corpuscule et le reste de la chromatine et permet de localiser celui-ci par rapport au nucléole (fig. 28).

Corpuscule Y

Nous avons vu qu'après coloration par la moutarde de quinacrine (bandes Q), le chromosome Y, chez l'homme, présente un segment très fluorescent au niveau de son bras long. Ce segment peut être détecté à l'interphase sous la forme d'un corpuscule brillant (corpuscule Y). Le corpuscule Y peut être mis en évidence dans un grand nombre de tissus (frottis buccaux, cellules amniotiques, fibroblates, spermatozoïdes...) (Pearson et coll., 1970).

Dans le cas de frottis, les préparations sont fixées 30 mn au Carnoy, égouttées et laissées à sécher. La technique de coloration est identique à celle que nous avons décrite pour les bandes Q (cf. p. 31). L'observation en fluorescence montre un ou plusieurs corpuscules brillants accollés ou non à la membrane nucléaire. On observe, dans chaque cellule, autant de corpuscules Y que le sujet étudié possède de chromosomes Y dans sa garniture chromosomique. L'interprétation des images est parfois délicate : en effet, on devra se méfier de la possibilité de faux positifs du fait de l'existence éventuelle d'un marqueur hétérochromatique très fluorescent (région péricentromérique du 3, par exemple).

○



Observation microscopique

Observation en lumière ordinaire

Pour les observations *en fond clair:* les mitoses sont recherchées au faible grossissement (x 10), analysées et photographiées avec un objectif de grossissement x 100. On a intérêt à avoir un objectif muni d'un diaphragme à iris, indispensable pour la fluorescence (voir plus loin). Pour l'observation en lumière ordinaire, l'iris sera ouvert au maximum; on utilisera un filtre vert.

Pour les observations et la photographie *en contraste de phase,* on emploiera de préférence un filtre orange.

Observation en fluorescence

Celle-ci nécessite un appareillage parfaitement adapté au matériel et aux fluorochromes employés. Actuellement, deux systèmes d'excitation sont disponibles:

Système d'excitation par transmission. — C'est le plus ancien. Le rayonnement provenant de la source (une lampe à vapeur de HBO 200 W, le plus souvent) est filtré (filtres d'excitation), traverse la préparation, chemine un moment avec le rayonnement de fluorescence jusqu'aux filtres d'arrêt qui ne laissent passer que ce dernier. Ce système nécessite l'immersion dans l'huile de la lentille frontale du condenseur et un parfait réglage en hauteur de celui-ci afin d'obtenir une focalisation optimale du rayonnement incident. Par ailleurs, compte tenu de l'intensité de ce rayonnement d'excitation et de la proximité éventuelle des pics d'absortion et d'émission du fluorochrome, il est difficile, avec ce dispositif, de supprimer totalement le fond sans diminuer l'intensité du rayonnement de fluorescence. L'utilisation du fond noir devrait s'imposer en transmission pour pallier cet inconvénient mais il requiert de grandes énergies d'excitation qui ne sont possibles qu'avec les filtres interférentiels.

Système d'excitation par «réflexion» ou épifluorescence. — Le terme de réflexion est impropre; il vient du fait que les rayonnements d'excitation et de fluorescence empruntent en partie le même chemin mais en sens opposé. En effet, le faisceau d'excitation, après avoir été filtré, est réfléchi, par l'intermédiaire d'un miroir dichroïque, à l'intérieur de l'objectif et tombe sur la face supérieure de la préparation. Le rayonnement de fluorescence est repris par l'objectif, traverse le miroir dichroïque et les filtres d'arrêt qui suppriment la fraction du rayonnement d'excitation ayant pu être diffusée dans cette direction. Ce dispositif présente théoriquement plusieurs avantages : l'objectif agit sur le rayonnement d'excitation comme un condenseur et la focalisation optimale est obtenue quand l'image est au point. En second lieu, le rayonnement d'excitation et de fluorescence cheminant en sens inverse, l'isolement de ce dernier peut être plus spécifique.

Si le second système paraît s'imposer théoriquement, en pratique, sa supériorité est moins évidente, en tous cas pour certaines applications cytogénétiques. En effet, les résultats de la coloration à la moutarde de Quinacrine sont bons, par contre, ceux de l'acridine orange sont inconstants : on assiste fréquemment à un affaiblissement rapide de la fluorescence, empêchant parfois la photographie. Par ailleurs, pour les colorations par l'acridine orange (après incorporation de BrdU, en particulier) une certaine «maturation» de l'image est nécessaire afin d'obtenir une bonne différenciation des régions vert-brillant et des régions rouge-sombre. Celle-ci est effectuée par une irradiation assez prolongée (de l'ordre de une à deux minutes) par le faisceau d'excitation. Cette «maturation» n'a souvent pas le temps de se produire avec l'équipement de fluorescence par réflexion et l'affaiblissement de l'image survient rapidement. Ceci est probablement dû aux caractéristiques mal adaptées aux préparations chromosomiques des filtres d'excitation proposés actuellement par les fabricants et, malheureusement, le choix des combinaisons disponibles est très restreint. Finalement, selon notre expérience, les meilleurs résultats, pour l'acridine orange, sont donnés par l'équipement par transmission avec filtres d'excitation BG 38 + BG 12 et filtre d'arrêt 50 (et éventuellement, filtre d'atténuation du rouge 65), en fond clair, ou bien, BG 38 + filtre interférentiel KP 500 et les mêmes filtres d'arrêt, en fond noir. Pour l'observation et la microphotographie, le diaphragme à iris de l'objectif x 100 est fermé de la quantité juste nécessaire pour éliminer le rayonnement diffusé sans trop diminuer l'intensité de l'image fluorescente (l'ouverture est en général diminuée de moitié).

Microphotographie

On doit utiliser des films à grain fin. Nous mentionnerons ici deux films qui donnent de bons résultats, et leurs conditions de développement :

— KODAK RECORDAK AHU 5786, révélé 8 minutes à 20° dans le révélateur KODAK PL 12, utilisé à la dilution 1 + 9.

— AGFA ORTHO 25, révélé 10 minutes à 20° dans le révélateur RODINAL, utilisé à la dilution 1 + 24.

La sensibilité de ces deux films, dans les conditions de prise de vue microphotographique, se situe aux environs de 25 ASA. En dépit de cette faible sensibilité, ces deux films sont utilisés aussi bien pour la photographie en lumière ordinaire qu'en fluorescence. On préférera toutefois le film AGFA, légèrement plus sensible, pour la microphotographie en fluorescence par transmission. Contrairement à une idée répandue, il ne faut pas utiliser un film rapide pour la photographie en fluorescence sous prétexte que l'image est de faible intensité: le gain en mise au point permis par l'exposition plus courte ne compensant pas la mauvaise résolution de ces films à haute sensibilité. Afin que le film reçoive le plus de lumière possible, il faut que le microscope soit pourvu d'un dispositif permettant, après la mise au point, le renvoi de la totalité de l'image fluorescente vers le film. La fin de l'exposition est déclenchée manuellement ou automatiquement selon les modèles. Les durées d'exposition sont de l'ordre de 3 minutes pour la moutarde de quinacrine et les bandes T colorées par l'acridine orange, de l'ordre de la minute pour les préparations ayant incorporé le BrdU, colorées aussi par l'acridine.

— Le tirage est fait sur papier KODABROM, ou équivalent, en général de format 18 x 24 cm. Les négatifs sont agrandis 7 fois environ, ce qui donne un agrandissement final de 2 800 fois. Pour les images en lumière ordinaire, on utilise la gradation G2 (normal), pour la fluorescence et coloration par l'acridine orange, G3 et pour la coloration par la moutarde de quinacrine, G5 (plus dur).

○



La nomenclature actuellement utilisée dans la plupart des laboratoires a été définie et précisée au cours de multiples réunions d'experts: Denver, 1961, Chicago, 1966, Paris, 1971, Stockholm, 1977.

L'essentiel des règles adoptées a été regroupé en un volume (ISCN, 1978). Seule, la nomenclature des chromosomes en prophase ou prométaphase fait l'objet d'un addendum. Il ne nous appartient pas de donner le détail de cette nomenclature ici, puisque cela nécessiterait un volume entier. La figure 29 représente la nomenclature des chromosomes métaphasiques en bandes R et en bandes Q.

Nous donnerons simplement les principes généraux de cette nomenclature, et quelques exemples d'application à la pathologie.

Formules chromosomiques normales et pathologiques

La formule chromosomique d'un individu se caractérise par le nombre diploïde de ses chromosomes, suivi de sa formule sexuelle soit:

46,XX et 46,XY pour la femme et l'homme normaux, respectivement.

Les différentes trisomies autosomiques viables se symbolisent ainsi:

47,XY, + 21

47,XX, + 18

47,XX, + 13

47,XY, + 8.

Les aneuploïdies sexuelles les plus caractéristiques sont:

47,XXY: syndrome de Klinefelter

45,X : syndrome de Turner

47,XXX

48,XXXX

48,XXXY

49,XXXXY

47,XYY: homme double Y.

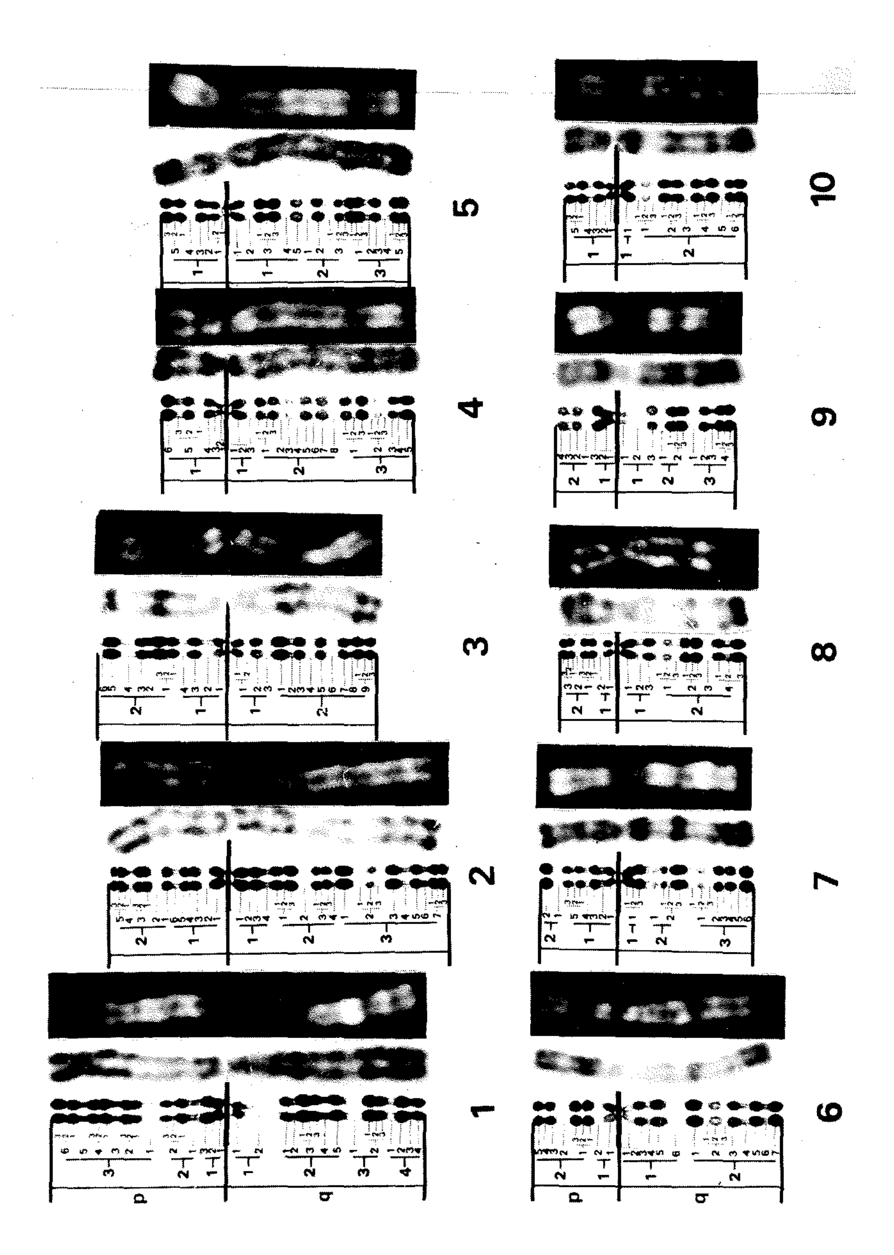


Fig. 29. – *Nomenclature du caryotype humain d'après Prieur et coll. (1973).*
Chromosomes en bandes R (à gauche) et en bandes Q (à droite)

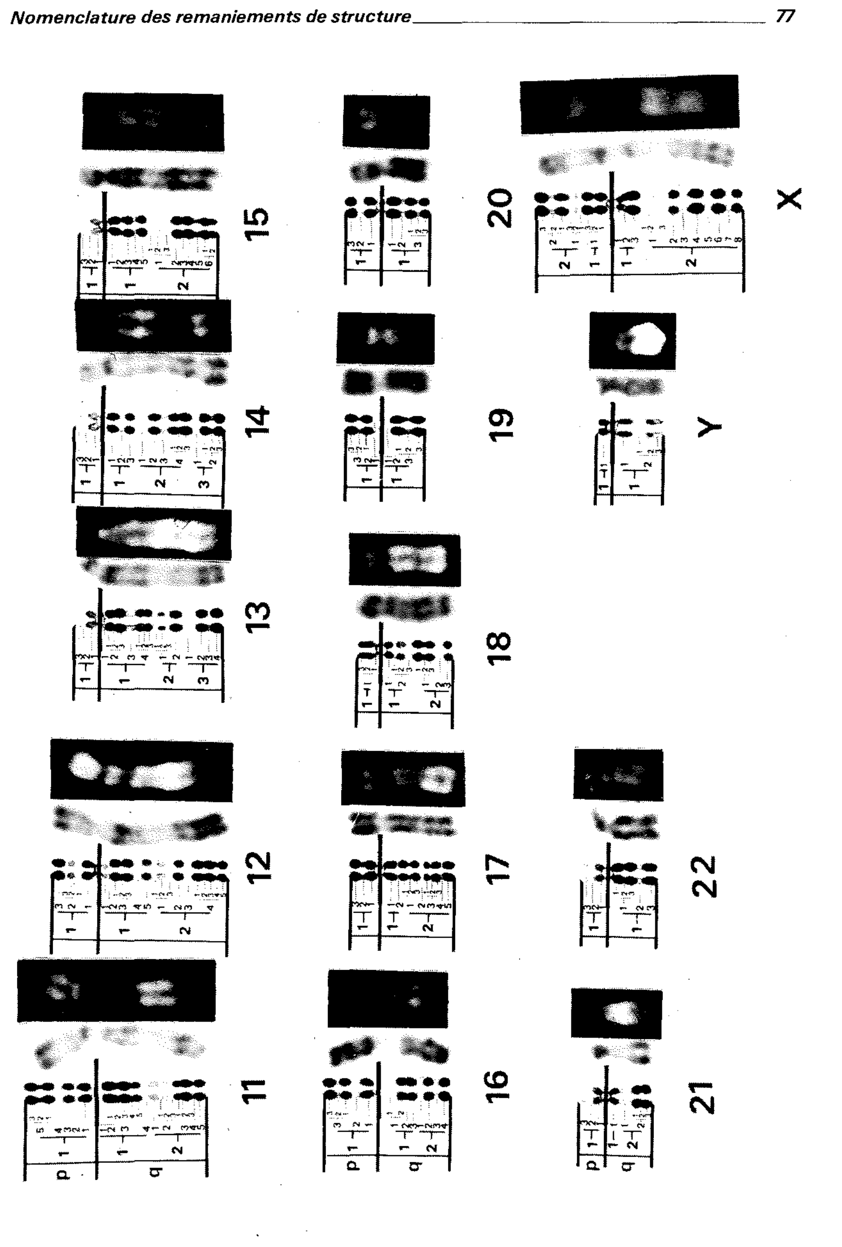


Fig. 29. – *Suite*

Les aneuploïdes autosomiques ou sexuelles peuvent s'observer en mosaïque, c'est-à-dire dans une fraction seulement des cellules :

46,XX/47,XX, + 21 : une lignée normale et une trisomique 21

46,XY/47,XXY : une lignée normale et une XXY (Klinefelter)

45,X/46,XX/47,XXX : une lignée haplo X (Turner), une lignée normale et une lignée triplo X.

Classification chromosomique et nomenclature des bandes

La classification du caryotype humain par groupes de A à G, adoptée un temps, est tombée en désuétude depuis l'utilisation du marquage qui permet de reconnaître chaque paire de chromosomes.

Cette classification est bien définie chez l'homme, et les figures de cet ouvrage, montrant des caryotypes, en sont autant d'exemples.

Il n'existe pas de règle absolue pour établir la classification du caryotype d'une espèce non étudiée antérieurement.

Les principaux critères restent la taille relative des chromosomes et la position du centromère. Celle-ci détermine la forme : métacentrique (centromère médian), acrocentrique (centromère distal) et sub-métacentrique (centromère en position intermédiaire).

A ces deux critères s'ajoute bien sûr le marquage, qui est devenu le seul véritable moyen d'identification.

Généralement, on classe d'abord les méta- ou sub-métacentriques, par ordre de taille décroissante, puis les acrocentriques. L'absence de règle stricte crée une grande confusion et le caryotype d'une même espèce peut connaître plusieurs classifications.

La nomenclature des bandes ne connaît pas une plus grande homogénéité d'une espèce à l'autre, aussi faut-il savoir se satisfaire de la quasi-unanimité concernant les chromosomes humains.

Chaque bras est symbolisé par une lettre p (bras court) et q (bras long), et subdivisé en régions (de 1 à 4). Les régions, qui sont délimitées par des repères cytologiques (bandes très, ou très peu colorées), sont subdivisées en bandes.

Ainsi, la 2e bande de la 3e région du bras court du chromosome 1 se définira par 1 p 32. La numérotation des bandes et des régions s'effectue des centromères vers les télomères.

Les bandes elles-mêmes peuvent être subdivisées en sous-bandes, lesquelles peuvent être encore subdivisées, par exemple 1 p. 32.12.

Les subdivisions des bandes sont indiquées par un point dans la formule. Elles s'avèrent nécessaires lorsque des chromosomes prophasiques sont étudiés.

Nomenclature des remaniements de structure

Les translocations, résultant le plus souvent d'un échange de segments entre 2 chromosomes se symbolisent par *t.*

t rcp signifie: translocation réciproque

t Rob signifie: translocation robertsonienne appelée aussi fusion centrique. Les translocations se définissent encore par les numéros des chromosomes atteints et leurs points de cassure:

t rcp (5; 7) (p 13; q 22).

Les numéros des chromosomes sont indiqués dans la première parenthèse, les points de cassure, dans la seconde et dans le même ordre.

t Rob (13q 14q) indique la translocation entre un 13 et un 14, avec des points de cassure non définis exactement, mais siègeant près des centromères.

Les inversions représentent un deuxième grand groupe d'anomalies structurales:

inv (4) (p 12; q 31) caractérise une inversion péricentrique du 4, après cassures dans les bandes p 12 et q 31.

inv (5) (q13; q32) caractérise une inversion paracentrique (2 cassures du bras long).

Parmi les autres anomalies, les délétions *(del),* et les anneaux *(r)* sont les moins rares en pathologie humaine.

Les dicentriques *(dic)* et, dans une certaine mesure, les anneaux sont des anomalies acquises, après irradiation par exemple.

Il existe une quantité d'autres aberrations, mais il est hors de propos de les citer toutes ici. Pour une connaissance précise de la nomenclature, on se rapportera au ISCN (1978) cité plus haut.

○

Bibliographie

ANGEL R.R., JACOBS P.A. (1975). — Lateral asymmetry in human constitutive heterochromatin. *Chromosoma* (Berl.), **51**, 301.

ARRIGHI F.E., HSU T.C. (1971). — Localisation of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* **10**, 81.

BELL S., WOLFF S. (1966). — Effects of FUdR and thymidine on incorporation of deoxycytidine into DNA of Vicia faba. *Exp. Cell. Res.* **42**, 408.

BLOOM S.E., GOODPASTURE C. (1976). — An improved technique for silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.* **34**, 199.

BOBROW M., COLLACOTT, H.E.A.L., MADAN K. (1972 a). — Chromosome banding with acridine orange. *Lancet* ii, 1311.

BOBROW M., MADAN K., PEARSON P.L. (1972b). — Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of n° 9. *Nature* (New Biol.), **238**, 122.

BOUÉ J., NICOLAS H., BARICHARD F., BOUÉ A. (1979). — Le clonage des cellules du liquide amniotique, aide dans l'interprétation des mosaïques chromosomiques en diagnostic prénatal. *Ann. Génét.* **22**, 3.

CARPENTIER S., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. (1972). — Effets du milieu ionique sur la dénaturation thermique ménagée des chromosomes humains. *Ann. Génét.* **15**, 203.

CASPERSSON T., ZECH L., JOHANSSON C. (1970). — Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA-binding fluorescent agents. *Exp. Cell Res.* **62**, 490.

COUTURIER J., CUNY G., HUDSON A.P., DUTRILLAUX B., BERNARDI G. (1981). — Cytogenetical and biochemical characterization of a dG + dc-rich satellite DNA in the primate *Cebus capucinus.* (Soumis pour publication à *Eur. J. Biochem).*

COUTURIER J., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. (1973). — Étude des fluorescences spécifiques des bandes R et des bandes Q des chromosomes humains. *C.R. Acad. Sci.* (Paris), **276**, 339.

CRAIG-HOLMES A.P., SHAW M.W. (1971). — Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* **174**, 702.

DUTRILLAUX B. (1971). — La culture de cellules germinales mâles : méthodes et applications. *Ann. Génét.* **14**, 157.

DUTRILLAUX B. (1973). — Nouveau système de marquage chromosomique: les bandes T. *Chromosoma (Berl.)* **41**, 395.

DUTRILLAUX B. (1975a). — *Sur la nature et l'origine des chromosomes humains.* Monographie des Annales de Génétique. L'Expansion Scientifique, Paris.

DUTRILLAUX B. (1975b). — Obtention simultanée de plusieurs marquages chromosomiques sur les mêmes préparations après traitement par le BrdU. *Hum. Genet.* **30**, 297.

DUTRILLAUX B., COUTURIER J., FOSSE A.M. (1980). — The use of high resolution banding in comparative cytogenetics: comparison between man and *Lagotrix lagotricha. Cytogenet Cell. Genet.* **27**, 45.

DUTRILLAUX B., COUTURIER J., RICHER C.L., VIEGAS-PÉQUIGNOT E. (1976). Sequence of DNA replication in 277 R- and Q-bands of human chromosomes using a BrdU treatment. *Chromosoma* (Berl.) **58**, 51.

DUTRILLAUX B., COVIC M. (1974). — Étude des facteurs influençant la dénaturation thermique ménagée. *Exp. Cell Res.,* **85**, 143.

DUTRILLAUX B., FOSSE A.M., PRIEUR M., LEJEUNE J. (1974). — Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Traitement au BUDR (5-bromodéoxyuridine) et fluorescence bicolore par l'acridine orange. *Chromosoma* (Berl.) **48**, 327.

DUTRILLAUX B., GROUCHY J. de, FINAZ C., LEJEUNE J. (1971). — Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier). *C.R. Acad. Sci. (Paris)* **273**, 587.

DUTRILLAUX B., LAURENT C., COUTURIER J., LEJEUNE J. (1973). — Coloration par l'acridine orange des chromosomes préalablement traités par le 5-bromodéoxyuridine (B.U.D.R.). *C.R. Acad. Sci.* (Paris) **276**, 3179.

DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. (1971). — Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. *C.R. Acad. Sci.* (Paris) **272**, 2638.

DUTRILLAUX B., VIEGAS-PÉQUIGNOT E. (1981). — High resolution of R- and G-banding on the same preparation. *Hum. Genet.* **57**, 93.

EVANS E.P., BRECKON G., FORD C.E. (1974). — An air drying method for meiotic preparation from mammalian tests. *Cytogenetics,* **3**, 289.

FONATSCH C. (1979). — A technique for simultaneous demonstration of G-bands and sister chromatid exchanges. *Cytogenet. Cell Genet.* **23**, 144.

FRANCKE U., OLIVER N. (1978). — Quantitative analysis of high-resolution trypsin-Giemsa bands on human prometaphase chromosomes. *Hum. Genet.* **45**, 137.

FUCIK W., MICHAELIS A., RIEGER R. (1970). — On the induction of segment extension and chromatid structural changes in *Vicia faba* chromosomes after treatment with 5-azacytidine and 5-azadeoxyuridine. *Mutation Res.* **9**, 599.

FUNAKI N., MATSUI S., SASAKI M. (1975). — Location of nucleolar organizers in animal and plant chromosomes by means of an improved N-banding technique. *Chromosoma* (Berl.) **49**, 357.

GAGNÉ R., LABERGE C. (1972). — Specific cytological recognition of the heterochromatic sement of number 9 chromosome in man. *Exp. Cell Res.* **73**, 239.

GALL J., PARDUE M.L. (1971). — Nucleic acid hybridization in cytological preparations. In: *Methods in Enzymology* **21**, pp. 470-480.

GERMAN J.L. (1964). — The pattern of DNA synthesis in the chromosomes of human blood cells. *J. Cell Biol.* **20**, 37.

GOSDEN J.R., BUCKLAND R.A., CLAYTON R.P., EVANS H.J. (1975). — Chromosomal localisation of DNA sequences in condensed and dispersed human chromatin. *Exp. Cell Res.* **92**, 138.

ISCN: An International System for Chromosome Nomenclature. *Birth Defects: Original Article Series.* The National Foundation. March of Dimes. Vol. XIV, n° 8, 1978.

JONES K.W. (1973). — The method of in situ hybridisation. In: *New techniques in biophysics and cell biology.* R.H. Pain et J. Smith ed., pp. 29-66. John Wyley, Chichester, Sussex.

KORENBERG J.R.F., FREEDLENDER E.F. (1974). — Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* (Berl.) **48**, 355.

LATT S.A. (1973). — Microfluorometric detection of deoxyribonucleric acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.) **70**, 3395.

LATT S.A., DAVIDSON R.L., LIN M.S., GERALD P.S. (1974). — Lateral asymmetry in the fluorescence of human Y chromosome stained with 33258 Hoechst. *Exp. Cell Res.* **87**, 425.

LATT S.A., STETTEN G., JUERGENS L.A., BUCHANAN G.R., GERALD P.S. (1975). — Induction by alkylating agents of sister chromatid exchanges and chromatid breaks in Fanconi anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash.), **72**, 4066.

LIN M.S., LATT S.A., DAVIDSON R.L. (1974). — Microfluorometric detection of asymmetry in centromeric region of mouse chromosome. *Exp. Cell Res.* **86**, 392.

LUCIANI J.M., MORAZZANI M.R., STAHL A. (1975). — Identification of pachytene bivalents in human male meiosis using G-banding technique. *Chromosoma* (Berl.) **52**, 275.

MAC GREGOR H., MIZUNO S. (1976). — In situ hybridization of «nick translated» ^{3}H ribosomal DNA to chromosomes from Salamanders. *Chromosoma* (Berl.) **54**, 15.

MOORE K.L., BARR M.L. (1955). — Smears from the oral mucosa in the detection of chromosomal sex. *Lancet,* ii, 57.

MOORHEAD P.S., NOWELL P.C., MELLMAN W.J., BATTIPS D.M., HUNGERFORD D.A. (1960). — Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613.

PALMER C.G. (1970). — 5-bromodeoxyuridine-induced constrictions in human chromosomes. *Canad. J. Genet. Cytol.* **12**, 816.

PARDUE M.L., GALL J. (1975). — Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. In: *Methods in enzymology,* **10,** pp. 1-16.

PEARSON P.L., BOBROW M., VOSA C.G. (1970). — Technique for identifying Y chromosomes in human interphase nuclei. *Nature,* **226,** 78.

PERRY P., EVANS H.L. (1975). — Cytological detection of mutagen exposure by sister chromatid exchange. *Nature,* **258,** 121.

PERRY P., WOLFF S. (1974). — New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature,* **251,** 156.

PRIEUR M., DUTRILLAUX B., LEJEUNE J. (1973). — Planches descriptives des chromosomes humains (Analyse en bandes R et nomenclature selon la conférence de Paris, 1971). *Ann. Génét.,* **16,** 39.

SANCHEZ O., YUNIS J.J. (1974). — The relationship between repetitive DNA and chromosomal bands in man. *Chromosoma,* (Berl.), **48,** 191.

SAUNDERS G.F., HSU T.C., GETZ M.J., SIMES E.L., ARRIGHI F.E. (1972). — Locations of human satellite DNA in human chromosomes. *Nature* (New Biol.), **236,** 244.

SCHERES J.M.J.C. (1976). — CT banding of human chromosomes. The role of cations in the alkaline pretreatment. *Hum. Genet.,* **33,** 167.

SCHNEDL W. (1971). — Banding pattern of human chromosomes. *Nature* (New Biol.), **233,** 93.

SCHWEITZER D., AMBROS P., ANDRLE M. (1978). — Modification of DAPI banding on human chromosomes by prestaining with a DNA-binding oligopeptid antibiotic, distamycin A. *Exp. Cell Res.,* **111,** 327.

SEABRIGHT M. (1971). — A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet,* ii, 971.

SEHESTED J. (1974). — A simple method for R-banding of human chromosomes, showing a pH-dependent connection between R and G bands. *Humangenetik,* **21,** 55.

SHAFER D.A. (1973). — Banding human chromosomes in culture with actinomycin D. *Lancet,* i, 828.

SKOVBY F. (1975). — Nomenclature: Additional chromosome bands. *Clin. Genet.,* **7,** 21.

SOBELL H.M., JAIN S.C. (1972). — Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. II. Detailed molecular model of actinomycin-DNA complex and its implication. *J. Mol. Biol.,* **68,** 21.

STEFFENSEN D.M. (1977). — Human gene localization by RNA-DNA hybridization *in situ.* In: *Molecular structure of human chromosomes.* J.J. Yunis ed., pp. 59-88, Academic Press, New York.

SUMNER A.T. (1972). — A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.,* **75,** 304.

SUMNER A.T., EVANS H.J., BUCKLAND R.A. (1971). — A new technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature* (New Biol.), **232,** 31.

SZABO P., ELDER R., ULLENBECK O. (1975). — The kinetics of *in situ* hybridization. *Nucleic Ac. Res.,* **2,** 647.

VERMA R.S., LUBS H.A. (1975). — A simple R banding technic. *Am. J. Hum. Genet.* **27,** 110.

VIEGAS-PÉQUIGNOT E. (1981). — Condensation et segmentation des chromosomes. Rapport R-5.059 C.E.A. France.

VIEGAS-PÉQUIGNOT E., DUTRILLAUX B. (1976a). — Segmentation of human chromosomes induced by 5-ACR (5-azacytidine). *Hum. Genet.* **34,** 247.

VIEGAS-PÉQUIGNOT E., DUTRILLAUX B. (1976b). — Modification spécifique des bandes Q et R par le 5-bromodéoxyuridine et l'actinomycine D. *Exp. Cell Res.* **98,** 338.

VIEGAS-PÉQUIGNOT E., DUTRILLAUX B. (1978). — Une méthode simple pour obtenir des prophases et des prométaphases. *Ann. Génét.* **21,** 122.

VIEGAS-PÉQUIGNOT E., DUTRILLAUX B. (1981). — Detection of G-C rich heterochromatin by 5-Azacytidine in mammals. *Hum. Genet.* **57,** 134.

XEROS N. (1962). — Deoxyriboside control and synchronization of mitosis. *Nature* **194,** 682.

YUNIS J.J. (1976). — High resolution of human chromosomes. *Science,* **191,** 1268.

YUNIS J.J., ROLDAN L., YASMINEH W.G., LEE J.C. (1971). — Staining of satellite DNA in metaphase chromosomes. *Nature* **231,** 532.

YUNIS J.J., SAWYER J.R., BALL D.W. (1978). — The characterization of high-resolution G-banded chromosomes of man. *Chromosoma* (Berl.), **67,** 293.

ZAKHAROV A.F., EGOLINA N.A. (1968). — Asynchrony of DNA replication and mitotic spiralization along heterochromatic portions of Chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* (Berl.), **23,** 365.

ZAKHAROV A.F., EGOLINA N.A. (1972). — Differential spiralisation along mammalian mitotic chromosomes. *Chromosoma* (Berl.), **38,** 341.

○

Index alphabétique.

Fournisseurs.

(Liste non limitative)

Tubes de culture :
— Ets Rossignol, 59, rue de Turenne, 75003 Paris.

Réactifs de culture :
— PHA-C : I.B.F., 35, av. Jean-Jaurès, 92390 Villeneuve-la-Garenne.
— PHA-P, Trypsine 1/250 : Difco (U.S.A.)
— Thymidine méthyle tritiée : C.E.A., service des molécules marquées, B.P. 2, 91190 Gif-sur-Yvette.

Colorants :
— Giemsa-R : R.A.L., 35, av. Jean-Jaurès, 92390 Villeneuve-la-Garenne.
— « Stains all » : Serva (Allemagne Fédérale).

Produits photographiques :
— Kodak-Pathé, 8-14, rue Villiot, 75012 Paris.

MASSON, Éditeur
120, Bd St-Germain
75280 Paris Cedex 06
Dépôt légal : 3e trim. 1981

Imprimé
en France

4160 - Imprimerie Bayeusaine
6-12, rue Royale
14401 Bayeux
Dépôt légal n° 4545 : 3e trim. 1981

Au cours de la dernière décennie, l'analyse chromosomique a été totalement rénovée, tant pour ce qui concerne les techniques utilisées que pour les applications innombrables qui en ont découlé.

Les auteurs ont grandement initié cette révolution technologique, mettant au point personnellement bon nombre des méthodes exposées dans cet ouvrage. Cette position privilégiée leur permet d'en indiquer tous les détails, toujours si importants lors de l'application de techniques quelque peu délicates.

B. Dutrillaux, Maître de Recherche au CNRS et J. Couturier, Chargé de Recherche au CNRS, travaillent à l'Institut de Progenèse, Université René Descartes.

ISBN : 2-225-**74052**-6